

博士論文

顕微法による自己組織化コロイドの電気的特性
に関する研究

Optical microscopy of colloidal self-assembly
for investigating the electrical properties

高知工科大学 大学院 工学研究科 基盤工学専攻

学籍番号 1126001

井上 昌一

Masaichi Inoue

目次

概要	3
第1章 序論	5
1.1 様々な相互作用	5
1.1.1 引力の概要:表面自由エネルギー	5
1.1.2 引力(ファン・デル・ワールス力)	6
1.1.3 斥力の概要	7
1.1.4 斥力(電気二重層の力)	8
1.1.5 2つの相互作用の競合	10
1.2 分散と凝集	12
1.2.1 分散と凝集の用語説明	12
1.2.2 コロイド凝集体の形	12
1.2.3 コロイド凝集体への引力・斥力	12
1.3 ゼータ電位	13
1.3.1 電気動力学効果	13
1.3.2 ゼータ電位	13
1.3.3 ゼータ電位の算出式	13
1.4 平衡状態におけるクラスター相	16
1.5 電荷符号反転の仕組み	17
1.6 本研究の目的	20
1.7 本研究の構成	20
第2章 装置	23
2.1 暗視野顕微鏡	23
2.2 電気泳動装置	24
2.2.1 ゼータ電位の算出式	24
2.2.2 真の泳動速度の算出方法	26
2.3 動的光散乱装置	28
2.3.1 動的光散乱の仕組み	28
2.3.2 動的光散乱の原理	29
2.4 FE-SEM	32
2.5 分光光度計	32
2.6 マイクロバブル発生装置	33
2.7 その他の装置	34
第3章 試料	35
3.1 ヒストンコア(ヒストンオクタマー)	35
3.2 シリカ粒子	35
3.3 ポリアリルアミンハイドロコロイド (PAH)	36
3.4 マイクロバブル (Microbubble, MB)	37

3.5	DNA	38
3.6	その他の試料	39
第4章	ヒストンのクラスター形成	41
4.1	本研究の目的	41
4.2	ヒストンのメゾクラスター形成における実験方法	42
4.3	動的光散乱によるヒストン溶液の測定	43
4.4	暗視野顕微鏡によるヒストン溶液の観察	44
4.5	FE-SEMによるヒストン溶液の観察	46
4.6	ヒストンメゾクラスターの電荷特性評価	47
4.7	遠心分離によるヒストンのクラスター形成	49
4.8	溶媒変化によるヒストンクラスター形成	52
4.8.1	ポリスチレン粒子のフィルター依存性	52
4.8.2	濃度変化に対するヒストンクラスターのフィルター依存性	52
4.8.3	トリス塩酸溶液の添加によるヒストンクラスターのフィルター依存性	53
4.8.4	リン酸溶液または酢酸溶液におけるヒストンクラスターのフィルター依存性	57
4.8.5	ヒストンクラスターの pH 依存性	59
4.8.6	塩添加によるヒストンクラスターのフィルター依存性	59
第5章	カチオン性高分子添加によるシリカ粒子の電荷符号反転	61
5.1	PAH 添加によるシリカ粒子の電荷符号反転	61
5.2	PAH 添加によるシリカ粒子の電荷符号反転から見積もる電荷量	62
第6章	カチオン性高分子添加によるマイクロバブルの電荷符号反転	64
6.1	本研究の目的	64
6.2	マイクロバブルの安定性評価	65
6.2.1	マイクロバブルの粒径算出	65
6.2.2	マイクロバブルの時間依存性	66
6.3	PAH添加によるマイクロバブルの電荷符号反転特性	66
6.4	2種類のPAH添加によるマイクロバブルの電荷符号反転特性の比較	69
6.5	マイクロバブルの電荷量の算出	71
第7章	アニオン高分子添加によるヒストンの電荷符号反転特性	72
7.1	DNA 添加によるヒストンの電荷符号反転	72
7.2	ヒストンクラスター及びヒストンオクタマーの電荷量算出	76
7.3	DNA・ヒストンクラスター複合体の電荷中和時における形状変化	82
第8章	まとめ	84
8.1	ヒストン溶液における平衡クラスターの存在	84
8.2	マイクロバブル表面における PAH の吸着過程	85
8.3	DNA 添加によるヒストンクラスター及びヒストンオクタマーにおける電气的評価	86
8.4	総括	87
	謝辞	88
	参考文献	89

概要

統計物理のフロンティア分野である強結合・強相関系について、異なる2つの領域を紹介する。量子揺らぎが優勢である低温域では、高温超伝導に代表される強相関電子系に注目が集まっている。一方、室温状態では、熱ゆらぎが優勢となり、原子系での可視化に位置づけられるコロイド系において、プラズマに代表される強結合が注目されている。この強相関、強結合は、統計物理学にとって残された課題である。強結合における代表例を2つ示す。1つ目は、同符号のコロイドによる反発力により生じる希薄コロイド系の結晶化がある。2つ目は、異符号のコロイドによる集積力の影響で、電荷を帯びたコロイド粒子は、多価のカウンターイオンを帯びた高分子と結合すると電荷符号反転する。この代表例として、ヒストンにDNAが結合し、凝集することで生じる高次構造化形成がある。しかし、室温コロイド系において、理論やシミュレーションは行われているが、基礎実験はまだ少ない。そこで、本研究では、コロイド粒子間の強結合における固体領域内にある金属微粒子や高分子コロイド、液体領域内にあるエマルジョン、気体領域であるマイクロバブルの3領域のなかで、気体領域であるマイクロバブル電荷符号反転と、固体領域であるシリカ粒子及び、ヒストンを利用した超コロイドの出現かつ電荷符号反転について検証する。

始めに、ヒストンオクタマーが、超コロイドを形成するかを調べた。超コロイド(Colloidal molecules)とは、各々のコロイド間におけるメソスケールの自己集積化による構造形成である。本研究では、超コロイド形成を平衡状態におけるクラスターの構造形成として議論する。まず、動的光散乱での測定、暗視野顕微鏡での観察、FE-SEMでの観察から、ヒストン溶液中でヒストンメゾクラスターを検知した。そして、ヒストンメゾクラスターは、80nmから100nmでサイズ分散し、ヒストン溶液中では、10nm程度のヒストンオクタマーと数 μm の凝集物と共存していることが分かった。また、遠心分離処理により、ヒストン溶液の濃度は変化せず、ヒストンオクタマーのみの状態からヒストンクラスターを形成することを、暗視野顕微で観察し、そのクラスターが、遠心分離処理の有無に関係なく、サイズかつ電荷量に再現性があることを確認した。したがって、自己集積化した平衡ヒストンクラスターが、存在すると考える。

次に、PAH添加による固体領域におけるシリカ粒子の電荷符号反転を調べた。この実験結果から、電荷反転特性における電荷的中和状態でのPAH濃度が、シリカ粒子の表面電荷を算出できる指標となることを確認できた。

さらに、PAH添加による気体領域におけるマイクロバブルの電荷符号反転特性を調べた。まず、電気泳動装置により、泳動速度のヒストグラム、移動度から、マイクロバブル及びマイクロバブル・

PAH 複合体が電荷的に安定分散しているといえる。その上、2 種類の鎖長が異なる PAH の電荷符号反転比較より、反転直前直後は、鎖長依存性がなく、反転後は鎖長依存性がある。さらに、シリカ粒子の電荷符号反転特性との比較から、マイクロバブルは、シリカ粒子の場合よりはるかに多量の PAH で電荷符号反転することが分かった。

最後に、DNA を添加し、ヒストンクラスター及びヒストンオクタマーの電荷符号反転を評価した。電気泳動装置による泳動速度のヒストグラム、移動度から、ヒストンクラスター及びヒストンクラスター・DNA 複合体は、電荷的に安定分散していることが分かった。そして、電荷的中状態における DNA の電荷モル濃度は、DNA の種類に関係なく一定の値を示した。この値から、実験値から見積もられた経験式とヒュッケル式を利用し、ヒストンクラスターの実効電荷量が、+300~+400 と算出でき、ヒストンオクタマーの電荷量は、電荷符号反転に利用する DNA の電荷モル量と近似でき、+32~+49 と見積もれた。

したがって、本研究は、気泡であるマイクロバブルや、ヒストンオクタマーと自己集積したヒストンクラスターの混合液において、PAH または DNA を添加し、電荷符号反転特性を評価することに成功した。

第 1 章 序論

1.1 様々な相互作用

1.1.1 引力の概要: 表面自由エネルギー[J1]

断面積 A の物質を分離する過程におけるポテンシャルエネルギーの増加は、破断部分間の引力に抗して、引き離す時の仕事(ΔW)で分かる。図 1.1 は、表面を引き離すのに必要とされる仕事の量を分離距離 H の関数として示している。その距離を無限に離すと、自由エネルギーは、増加する表面積($2A$)に正比例する。これは表面過剰自由エネルギー(surface excess free energy)と呼ばれる。

$$\Delta G = \Delta W = 2\sigma^0 A \quad (1.1)$$

ここで、比例因子 σ^0 は表面張力(surface tension)あるいは界面張力(interfacial tension)である。



図 1.1 原子間(あるいは分子間)力

分離が起こりうる界面内の分子も、始めは、バルクである。そして、分離されると、全く異なった分子環境で、異なるエネルギーをもつ表面分子となる。したがって、自由エネルギーの増加は、分子がバルク物質の一部であるときの分子間力と、表面分子がうける分子間力との差から生じる。

まず、真空中あるいは不活性気体中で形成される場合、全ての間隔で引力が働いているから、自由エネルギーは、2つに割られた表面が接近するにつれて減少し、それらの表面は、再び結合する。これは、微粉末の固(コーク)化という現象にみられる。

次に、液体中の場合、分割表面間の空間が、純粋な液体で満たされるため、それらの間の分子間力は減少し、相互作用のエネルギー曲線は、液体中で減少する。

この二つの状態をグラフに表すと、図 1.2 となる。また、エネルギー曲線は、引力の自由エネルギー $\Delta G^{\text{att}}/2A$ で表すと、表面が近づくにつれてだんだん負の値が大きくなり、安定する。

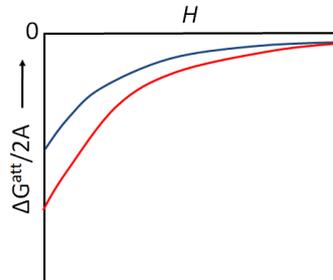


図 1.2 2つの引力の概要図
赤線は、真空中、青線は、液体中

1.1.2 引力(ファン・デル・ワールスカ)[J2]

コロイド粒子間の引力的なファン・デル・ワールスカは、それぞれの粒子に含まれる分子間の分散力に起因すると考えられている。有効な相互作用を計算するために、全体のポテンシャルは、対となる分子間のポテンシャルの和と仮定すると、ポテンシャルは対加算的となる。この近似では、分子間の相互作用は、他の分子の存在に影響されないと仮定されているため、多体相互作用は無視される。対ごとのポテンシャルの和は、粒子 1 上の微視的な体積 dV_1 内の分子と粒子 2 上の体積 dV_2 内の分子の間の対ポテンシャルを粒子全体の体積を積分する (図 1.3)。

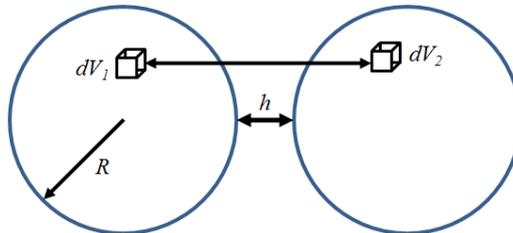


図 1.3 コロイド間の粒子間力を計算するモデル

結果として生じるポテンシャルは、コロイド粒子の形と粒子間の距離に依存する。真空中では、距離 h だけ隔てた 2 つの無限に広い平面の場合、単位面積あたりのポテンシャルは、

$$V = -\frac{A_H}{12\pi h^2} \quad (1.2)$$

となる。 A_H はハマーカー一定数で、コロイド粒子間のファン・デル・ワールス相互作用の実質的な強さを決める。コロイド粒子間の引力相互作用は、個々の分子の分散相互作用よりもずっと穏やかに減少する。

半径 a の 2 つの粒子の間隔が小さいとき、デルヤキン(Derjaguin)近似より、2 つの曲がった表面間

のポテンシャルを2つの平らな表面間のポテンシャルに関係づけることができる。これにより、

$$V = -\frac{A_H a}{12h} \quad (1.3)$$

と修正される。これは、真空中のコロイド粒子に対して適用される。また、粒子間に液体の媒体があるとき、ファン・デル・ワールスポテンシャルは、著しく減少するため、ハマーカー定数は、有効値によって置き換える必要がある。その詳細は以下に示す。

溶媒3中のコロイド粒子1と2の間の相互作用を考える。粒子が遠く離れていれば、それぞれの粒子は実質的には3と独立に相互作用し、全体のハマーカー定数は、2つの粒子・溶媒の和となる。しかし、粒子2が粒子1の近づいた時、もともと粒子1の近くにいたタイプ3の粒子は、粒子2と置き換わる。したがって、粒子1は類似の物体(粒子2)と相互作用している。唯一の違いは、媒体3の分子が、粒子2の分子に置き換わるだけである。したがって、媒体3の存在下で、粒子2を粒子1の近くに持つのに必要とするポテンシャルエネルギーは、真空中よりも小さいため、有効ハマーカー定数は、粒子・粒子の寄与と媒体・媒体の和となる。

しかし、ロンドン(London)分散力を対ごとに加えていくハマーカーのアプローチは、近似的なアプローチのため、多体分子間相互作用が無視されている。実際は、一方の双極子が、他方の双極子の揺らぎに応答して、再配向するのに有限の時間がかかるが、ロンドン方程式は、誘起された双極子間の相互作用に遅延がないことを仮定している。その対策として、リフシツツ(Lifshitz)理論がある。この理論は、相互作用している粒子と分散媒がすべて連続的であることを仮定し、ハマーカー理論のような粒子の形状変化による加算性の複雑性を排除している。

1.1.3 斥力の概要[J1]

二つの表面の間の媒体が、純粋な液体でなく、ある種の溶液の場合、新しい現象が起こって表面の間に斥力を生じる。もし、そのような斥力が存在するならば、表面間の距離を減少する時、仕事が必要となる。すなわち、斥力で生じる自由エネルギーは、間隔が減少するにつれて増大する(図1.4)。

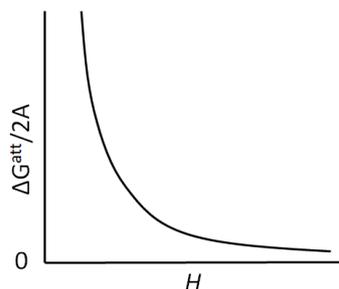


図 1.4 斥力の概要図

1.1.4 斥力(電気二重層の力)[J2]

溶液中における帯電したコロイド粒子間の場合、コロイドの表面電荷がつくる層の外側に隣接して、対イオンが別の層をつくって偏在し、電気二重層を形成する。2種類の電気二重層モデルを以下で示す(図 1.5)。

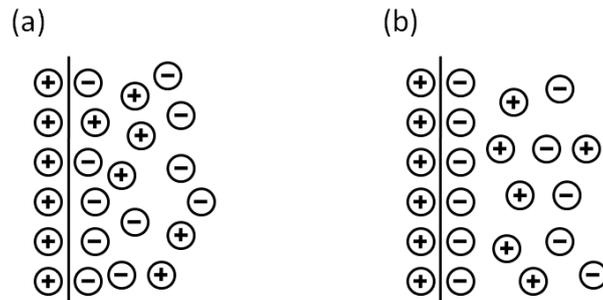


図 1.5 帯電したコロイドの電気二重層モデル
(a) 拡散二重層モデル (b) スターンモデル

拡散二重層のモデルは、イオン雰囲気は2つの領域が生じるとされる。2つ領域とは、コロイド粒子付近にいるイオンが、強い静電力のため対イオンが支配的になろうとする領域と、粒子からより遠ざかったイオンが、電気的な力と熱運動によるバランスに従って、より広がって分布する領域である。この2つを考慮すると、対イオンの濃度は、表面から離れるにつれて徐々に減少する。拡散二重層モデルは、カウンターイオンが、コロイド表面に多く分布しているが、はっきりとした平面はない。一方、スターン(Stern)のモデルは、対イオン雰囲気の内側の領域と外側の拡散領域の界面を、はっきりとした平面(スターン平面)があると仮定し、内側の領域は、対イオンの単一層から成り立つスターン層と仮定している。

拡散二重層は、グイーチャップリン(Gouy-Chapman)の式を利用する。グイーチャップマンの式は、平面の拡散二重層に対するポアソン-ボルツマン(Poisson-Boltzman)方程式の解である。ポアソン-ボルツマン方程式は、静電ポテンシャルと荷電成分の分布や濃度とを関係づけている。電解質溶液の電荷分布は、ボルツマン分布によって表される。静電ポテンシャルが、 Φ の点において、プラスイオンとマイナスイオンの濃度は、

$$c_+ = c_0 \exp\left(\frac{-ze\Phi}{k_B T}\right) \quad (1.4)$$

ならびに、

$$c_- = c_0 \exp\left(\frac{+ze\Phi}{k_B T}\right) \quad (1.5)$$

で与えられる。ここで、 c_0 は価数 z のそれぞれのイオン種の数密度である（モル濃度は c_0/N_A ）。そして、過剰電荷密度は、

$$\rho = ze(c_+ - c_-) \quad (1.6)$$

となる。ちなみに、 e は単位電荷である。これをポアソン方程式に代入することで、帯電した表面からの距離 x の関数としてポテンシャルの表式を与えることができる。ポアソン方程式は、

$$\frac{d^2\Phi}{dx^2} = -\frac{\rho}{\varepsilon} \quad (1.7)$$

である。ここで、 ε は溶媒の誘電率である。（ $\varepsilon = \varepsilon_r \varepsilon_0$, ε_r は非誘電率, ε_0 は真空の誘電率である）任意の境界条件における一般解は非常に複雑である。

$ze\Phi_0/(k_B T) \ll 1$ の場合、すなわち表面電位 Φ_0 （すなわち $x=0$ における電位が、 $k_B T$ よりもはるかに小さい、または、電解質が弱く帯電しているような系に対し、電位はグーチャップマンの式は

$$\Phi = \Phi_0 \exp(-\kappa x) \quad (1.8)$$

と表せられる。このときの電位は、距離の増加に対して指数関数的に減衰する(図 1.6)。

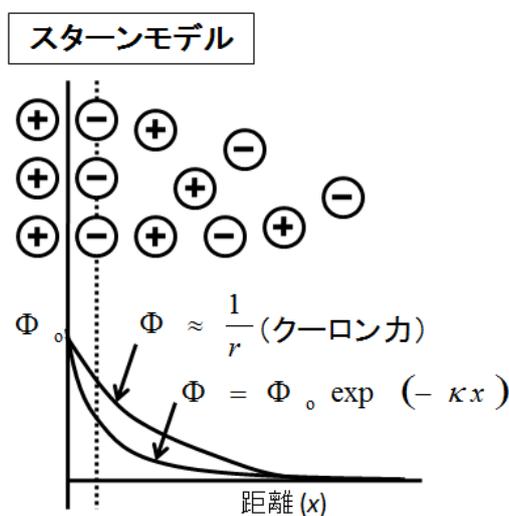


図 1.6 グーチャップマン式におけるグラフ

さらに、スターンモデルにおける電気二重層の厚さは、デバイ(Debye)の遮へい長(screening length)で表すことが出来る。この遮蔽長は、 κ^{-1} で示され、その式は以下のようなになる。

$$\kappa = \left(\frac{e^2 \sum_i c_i z_i}{\epsilon k_B T} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (1.9)$$

この式から、荷電コロイドの周りのイオン濃度が減少すると、電気二重層が厚くなり、コロイド粒子が分散しやすくなるが分かる。

1.1.5 2つの相互作用の競合[J1]

まず、安定性についての概要を述べる。図 1.7 のように、直方体の箱を、机の上にたてる時、表面積の大きい面を下にした方が安定する。これを、安定平衡(stable equilibrium)という。しかし、表面積が小さい面を下にしても、箱は安定することができる。これを、準安定平衡(metastable equilibrium)と呼ぶ。準安定平衡のとき、衝撃、つまり運動エネルギーを加えると、安定平衡状態へ移動する。これは、準平衡状態から平衡状態に移動するときに、準平衡状態より高い自由エネルギーの壁（エネルギーの丘、エネルギー障壁）を超える必要がある。このエネルギー障壁の大小により、どちらか一方のエネルギー極小に落ち込む。この中間的な状態は、不安定な平衡(unstable equilibrium)という。

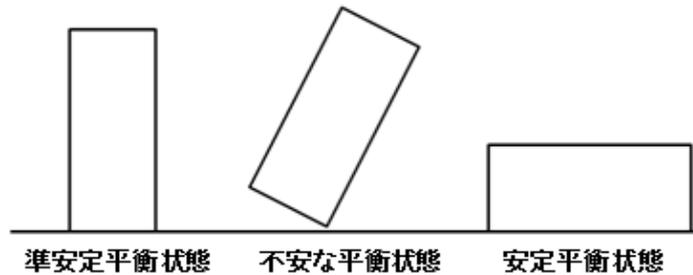


図 1.7 3種類の平衡状態

以上の平衡状態を、縦軸にポテンシャルエネルギーとしたグラフの概図は、図 1.8 となる。

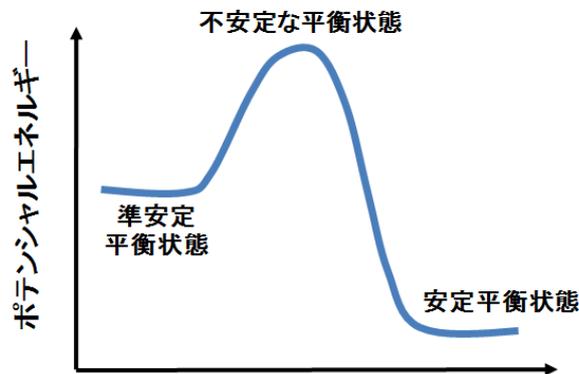


図 1.8 ポテンシャルエネルギーにおける平衡状態

通常、全自由エネルギーは引力と斥力の和で表すことができる。そのため、これらの二つの力の働く範囲と相対的強さの違いから、多様な全自由エネルギー曲線が得られる。いくつかの典型的なかたちを図 1.9 で示す。

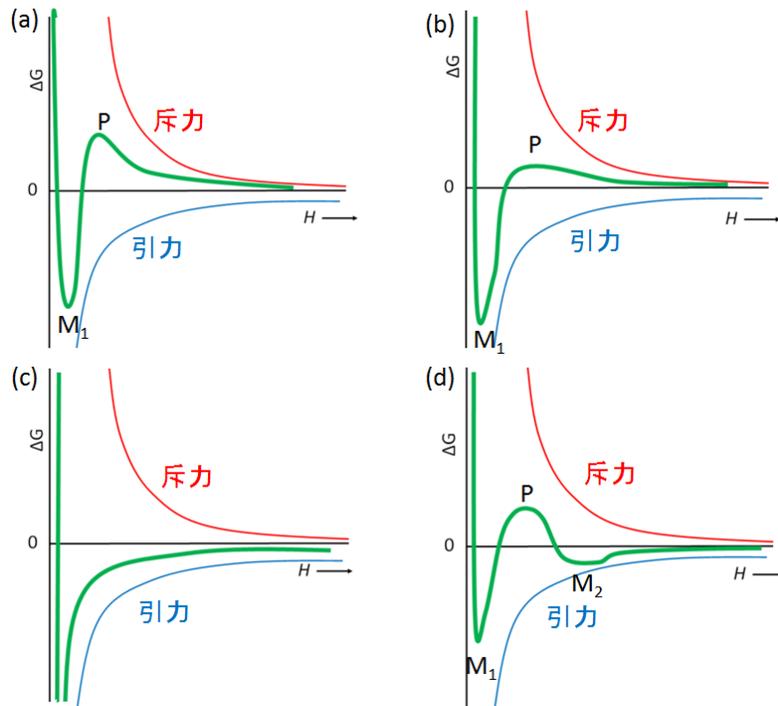


図 1.9 引力(青線)と斥力(赤線)の競合で生じる全相互作用自由エネルギー(緑線)の型

図 1.9(a)は、強い斥力相互作用から生じる高い自由エネルギー障壁（第一極大 P）によって、凝集状態に到達することを阻むため、準安定平衡状態である分離状態が存在し、コロイド的に安定 (colloidally stable) する。図 1.9(b)は、斥力相互作用の減少あるいは、それらの領域の減少によるエネルギー障壁の低下した場合で、コロイド粒子のブラウン運動で移動可能な熱エネルギー数 $k_B T$ 以下ならば、系は第一極小 M_1 に到達する。また、図 1.9(c)のように、エネルギー障壁の消滅する場合も同様に M_1 に到着する。この 2 つのグラフは、コロイド的に不安定になり、分散せずに凝集する。図 1.9(d)は、第一極小に到達する前に浅い極小（第二極小 M_2 ）が存在する場合である。この第二極小の存在は、コロイド間の弱い結合による安定化、結晶化状態を示し、 $k_B T$ と同等であれば、可逆的なフロキュレーションが起こる。これは、ルヤギン - ランダウ - ベイウエイ - オーバービーク (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) を略した理論である DLVO 理論で示され、多くのコロイド分子間の状態を説明できる。また、この理論は、一般に引力的な長距離のファン・デル・ワールス力と電気二重層間の力（同符号に帯電した粒子に対して斥力）を考慮している。

1.2 分散と凝集

1.2.1 分散と凝集の用語説明[J1]

全ての粒径が同じ粒子の分散系は、単分散(monodisperse)で、粒径の大きさにばらつきがあるときは、多分散(polydisperse)という。また、ある状況下で、分散相の粒子は互いに付着して連続的にサイズが大きくなった集合体を形成する。これは、熱運動に関係なく、重力の影響で系が分離することがある。集合した物質の性質は、その生成条件に依存し、時間とともに変化することもある。最初に生じた少し隙間のある集合体を凝集体(floc)といい、その過程を凝集(flocculation)という。もし、集合体が、より緻密になると、凝結物(coagulum)が生成される。これを凝結(coagulation)と呼ぶ。集合体は、媒体より密度が大きい時は、沈降(sedimentation)し、媒体より密度が小さい時は、クリーム化(creaming)し浮遊する。凝集と凝結の違いは、凝集が、脱凝集(deflocculation、解こう)の過程によって逆行できるのに対し、凝結は、逆行できない不可逆的な現象であると考えられている。しかし、実際には、凝結した系でも再分散されることがある。

1.2.2 コロイド凝集体の形[J3]

コロイド間の相互作用が強くなると、単純な分子性液体では見られない自己組織化したコロイド凝集体を形成する。この凝集体は、接触後、結合した状態を継続する。その結合した接触を最大にするため、すかすかな構造を形成する。そして、ある粒子から半径 a の範囲内にある平均粒子密度は、 a の増加とともに減少するため、巨大な凝集体でも、その中の平均密度は小さくなり、凝集体は、フラクタル構造になる。

1.2.3 コロイド凝集体への引力・斥力[J3]

コロイド溶液では、斥力が十分に強いと、コロイド粒子の秩序状態を誘起し、溶液中で周期的な格子構造を形成しやすい。しかし、引力が十分に強いと、自己組織化が誘起される。引力が引き起こす代表的な現象は、沈殿とクリーミングである。沈殿するコロイド粒子は、溶液中で分散するよりもコンパクトな塊として集合するほうを好み、粒子間の相互引力エネルギーは最大になる。このような沈殿が起こるのは、2個の粒子が互いに接近している確率が、遠く離れている確率よりもはるかに高いときであり、2個の粒子間引力が、十分強ければ、粒子や、すでにグループ化した粒子とも結合する。そのため、結合のプロセスは、自己増殖的に進み、粒子は、コンパクトで巨視的な塊すなわち「凝集相」を形成する。

相転移の理論は、粒子が少なくとも局所的に熱力学的な平衡状態に達したときだけ適用される。そのため、平衡状態とは、十分に長い時間が経過した後には到着する状態となるので、系の任意の状態変化に対して、その変化を元に戻すための時間が必要である。通常、小さな分子の相分離は、非常に速いため、各々の局所的な領域は熱平衡状態に近いが、コロイドは、平衡状態から遠く離れた

不可逆的な引力が生じている。それは、コロイド間引力の強さが、粒子サイズとともに増大するため、大きな粒子の引力エネルギーは、熱エネルギーよりもはるかに大きい時、不可逆的に結合することを示している。このため、結合している2個の粒子は、観察している時間内に離れることなく、平衡状態は成立しない。そこで、相転移の理論は適さないので、動的凝集による凝集体形成という違う考え方を利用する。始め、コロイド粒子は、非常に希薄な状態で分散している。そこに、大量の塩を添加すると、粒子の斥力的なクーロン障壁が、ほぼ完全に遮蔽され、粒子間のファン・デル・ワールス引力による凝集体が形成される。そして、2個の粒子は、ブラウン運動中に出会うと永久的に結合してしまう。その結果、形成される粒子の塊は、他の粒子やクラスターと出会うまでブラウン運動を連続的に続けるため、樹状構造をもち、同じフラクタル次元をもつ。これは、シミュレーションや実験により証明されている。

1.3 ゼータ電位

1.3.1 電気動力学効果[J2]

コロイド粒子が電荷を帯びている時、電場は分散系の流動挙動に対して強い影響を与えるため、多くの電気動力学現象が生じる。電気泳動の測定は、静止した液体中で、印加された電場によって移動する帯電コロイド粒子の速度を測定する。この測定から易動度は、

$$u = \frac{v}{E} \quad (1.10)$$

と導かれる。ここで、 v は粒子の速度、 E は電場の強さである。そして、静止した電荷を通過する液体の流れが原因で、2つの電気運動学的効果が生じる。電気浸透は、印加された電場によって、静止した荷電表面（たとえば、毛細管の壁）を通過する液体の流れで引き起こされる。この流れを相殺するのに必要な圧力は、電気浸透圧と呼び、反対に、流体の流れによって生じる電場は、流動電位と呼ぶ。

1.3.2 ゼータ電位[J2]

ゼータ電位は、静止した液体と運動している帯電コロイド粒子との間の界面における電位である。この界面は滑り面（ずり面）で、電気二重層より外側の層であるが、多くの場合、電気二重層と滑り面は近似される。また、ゼータ電位は、電気二重層間の反発相互作用を表す表面電位よりも簡単に測定でき、コロイド分散系の安定性を示す指標となる。

1.3.3 ゼータ電位の算出式[J2]

ヒュッケル(Hückel)式とスモルコフスキー(Smoluchowski)式は、電気泳動を行っているコロイド分

散系の易動度において、ある極限における解である。帯電したコロイド粒子が、十分小さい非摂動電場中に存在する場合、点電荷として扱えるので、ヒュッケル式が適用できる。他方、コロイド粒子の半径が大きく、平坦な帯電表面として近似できる場合、スモルコフスキー式が、易動度を求める式として利用できる。

まず、外部電場が点電荷に作用する($\kappa a \ll 1$)と仮定したヒュッケル式について説明する。直流電場の強さ E の電場をかけた状態で、電荷 q の孤立したコロイド粒子に作用する電氣的な力は、

$$F = qE \quad (1.11)$$

と表すことが出来る。この式は、コロイド粒子が、加えられた電場を変えないときに成り立つ。ヒュッケル式は、この電氣的な力が溶媒の粘度に起因する摩擦力に等しいと仮定するため、

$$F = qE = f v \quad (1.12)$$

となり、この摩擦力は、ストークスの法則より

$$f = 6\pi\eta a \quad (1.13)$$

で示される。ここで、 f は摩擦係数、 η は媒体の粘度、 v は速度、 a は流体力学的半径（粒子周辺を局所的に流れる液体に対して粒子が示す実効的な半径）である。式 1.13 を式 1.12 に代入して、

$$F = qE = 6\pi\eta a v \quad (1.14)$$

となり、粒子が定常的に動いているとき、これらの 2 つの力は釣り合うので、易動度に対するヒュッケルの式

$$u = \frac{v}{E} = \frac{q}{6\pi\eta a} \quad (1.15)$$

が得られる。易動度は、一般にゼータ電位 ζ に関係している。デバイーヒュッケル理論を用いてゼータ電位の近似的な式を導くことができる。ゼータ電位は、運動している電気力学的な構造単位（電荷 $+q$ ）と二重層中の流動可能な部分（電荷 $-q$ ）との間の表面における電位であり、

$$\zeta = \frac{q}{4\pi\epsilon a} - \frac{q}{4\pi\epsilon(a + \kappa^{-1})} \quad (1.16)$$

で与えられる。ここで、イオン雰囲気（厚さが κ^{-1} より、 a よりはるかに大きくなったとき、つまり、 $\kappa a \ll 1$ のときは、

$$\zeta = \frac{q}{4\pi\epsilon a} = \frac{6\pi\eta u}{4\pi\epsilon a} = \frac{3\eta u}{2\epsilon} \quad (1.17)$$

の近似式が得られる。ここで、 u は易動度を示す。

次に、二重層が十分薄い、または a が十分大きい場合($\kappa a \gg 1$)に適用されるスモルコフスキー式について説明する。電気二重層を持つ固-液界面に、外部より直流電場を界面の平行に印加した場合、固体面は、静止しているため、溶液側に層流が発生すると、界面に沿って速度が分布する。いま、溶液中に微小なコロイドがあるとすると、定常状態で、コロイドに作用する電気力と粘性力が釣り合う。立方体中の平均電荷密度を ρ' とすれば、電気力は

$$F = \rho'E \quad (1.18)$$

となり、粘性力である

$$F = \eta \frac{d^2u}{dx^2} \quad (1.19)$$

と釣り合っているので、

$$\rho'E = \eta \frac{d^2u}{dx^2} \quad (1.20)$$

と表せて、この関係にポアソン式を代入し、2回積分すると、

$$V = \frac{\varepsilon}{\eta} \phi_0 E \quad (1.21)$$

となり、表面電位 ϕ_0 は、ゼータ電位 ζ と近似できるので、

$$\zeta = \frac{\eta V}{\varepsilon E} = \frac{\eta u}{\varepsilon} \quad (1.22)$$

と求めることができる。スモルコフスキーの式は、 $\kappa a \gg 1$ の極限を示すため、任意の形状の大きな粒子に有効で、半径の大きな円筒粒子にも適応できる。

しかし、ヒュッケルの式とスモルコフスキーの式は、有益な極限法則のため、実際のコロイドゾルに対して、完全に適しているとはいえない。なぜならば、 $\kappa a \ll 1$ と $\kappa a \gg 1$ の極限は、実際にはほとんど満たさないためである。そこで、同じ条件下でのヒュッケル式から算出したゼータ電位は、スモルコフスキー式の1.5倍になるので、ヘンリー(Henry)は、ヒュッケル式とスモルコフスキーの間には、粒子の存在による電場の歪みの有無があると考え、 κa の関数を導入した。これがヘンリー式で、

$$u = \frac{2\zeta e}{3\eta} f(\kappa a) \quad (1.23)$$

となる。希釈溶液中の非常に小さい粒子に対しては、 κ^{-1} が非常に大きいので、 $\kappa a \rightarrow 0$ となる。この極限では、 $f(\kappa a)=1$ であり、ヒュッケル式に戻る。大きな粒子の極限では、 $f(\kappa a)=1.5$ となり、スモル

コフスキーの式が得られる。ヘンリーの式は、これらの極限の間の $f(\kappa a)$ の値（ヘンリー係数）を考慮に入れている（図 1.10）。

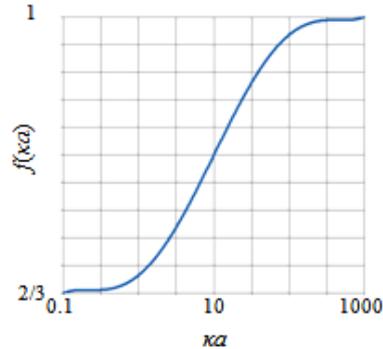


図 1.10 ヘンリー係数 f の κa による変化

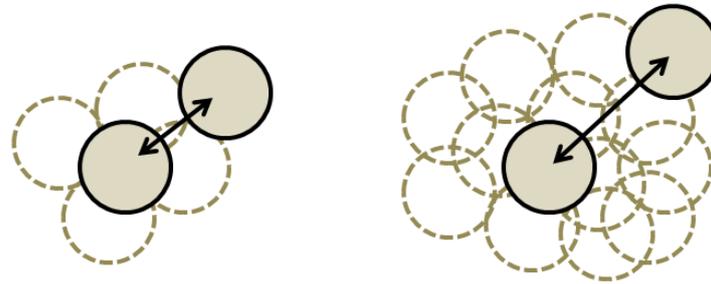
しかし、易動度とゼータ電位には、緩和効果という問題が残る。緩和効果とは、溶液中で、イオンを電場で引き寄せると同時に、反対方向に移動するイオンの影響で引き戻される現象である。強電解質の場合、反対に移動するイオンの雰囲気が大きいため、粒子の電気二重層が変形して非対称になるため、逆の電気力が作用する。この複雑な現象は、数学的困難を伴うため、コンピュータによる数値解析法が試みられ、オブライアンとホワイト(O'Brien-White)は、無次元化した泳動速度を以下のように定義している[1]。

$$E_m = \frac{3\eta ze}{2\epsilon kT} u \quad (1.24)$$

計算結果を要約すると以下の通りである。ゼータ電位が 50mV 以下のコロイド系の電気泳動、または、 $\kappa a \ll 1$ または、 $\kappa a \gg 1$ の場合、緩和効果は無視できる。また、 $1 < \kappa a < 100$ で、かつゼータ電位が 75mV 以上のコロイド系の u は緩和効果が大きく影響され、 u の値からゼータ電位を見積もることは困難である。

1.4 平衡状態におけるクラスター相

界面活性剤やブロックポリマー共重合体は、親水基と疎水基があり、溶媒中で、モノマーのみで分散せず、ミセルを形成し安定する。これは、近距離引力と長距離引力の2つの相互作用の競合に起因している。そして、先ほど示した DLVO 理論で説明できない、この2つの相互作用の競合は、コロイド粒子でも生じている。この競合を2つの粒子に注目すると、近距離では、引力が生じ、一定の距離以上に離れると、斥力が働く、この競合により、平衡クラスターが形成される（図 1.11）。



2つの粒子間で引力が生じる

2つの粒子間で斥力が生じる

図 1.11 2つの相互作用によるクラスター形成

この競合を制御してクラスター形成を行う研究は、シミュレーションや実験の報告がある [2,3]。また、枯渇効果による長距離斥力の精密な制御が可能になったため、クラスター結晶やクラスターガラスの研究が活発である (図 1.12) [4-6]。

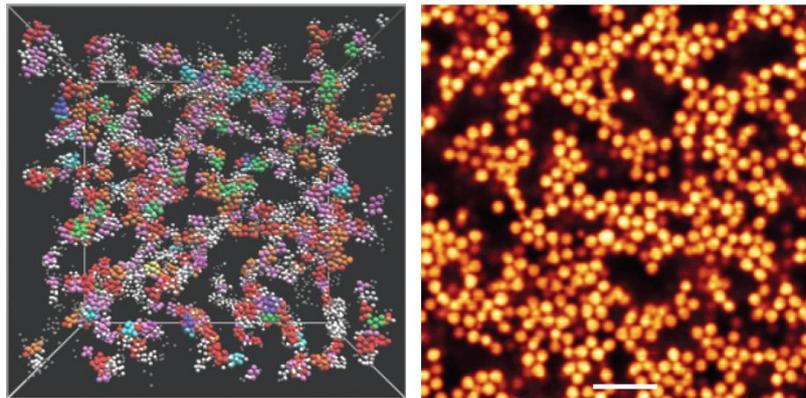


図 1.12 長距離斥力を制御したクラスター形成[4]

左図は、シミュレーション結果、右図は、コロイド粒子の実験結果

1.5 電荷符号反転の仕組み

異符号の電荷の強結合における電荷符号反転特性について述べる。通常、負電荷物質と正電荷物質が共存する時、お互いに結合し、中和状態になり沈殿する。しかし、巨視イオンや荷電コロイド粒子に対し、多価のカウンターイオン、または、多価のカウンターイオンをもつ高分子が、その周辺に存在する場合、粒子の拡散に必要とされる熱エネルギーよりも、クーロン引力の強さが大きくなり、電荷符号反転の現象が生じる。図 1.13 は、負電荷である巨視イオンの周辺に、3 価の正イオンが周辺に存在する状態を示し、クーロン引力が大きいため、巨視イオンの表面に 3 価の正イオン

が吸着している。そのため、巨視イオンの表面は、正電荷を帯びた状態となり、電荷符号反転が起きている。

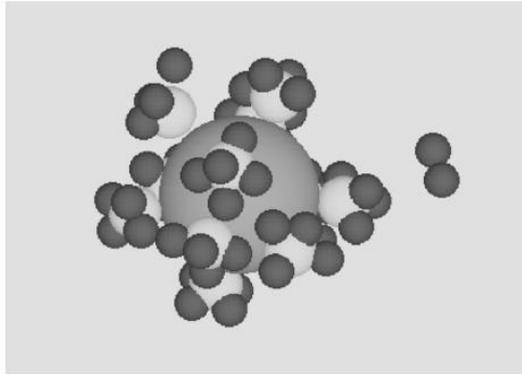


図 1.13 負の巨視イオンにおける 3 価の正イオンの挙動[7]

この電荷符号反転の典型的な例として、DNA とヒストンにより構成されているクロマチンがある[8]。クロマチンは、図 1.14 のような構造をしている。これは、正電荷を帯びたヒストンコアに負電荷を帯びた DNA が巻きついてヌクレオソームとなり、それが凝集することで高次構造が形成されている。そして、クロマチンは、中和されず沈殿することなく、負電荷を帯びている。これは、ヒストンの周辺に、多価の高分子である DNA が存在するため、クーロン引力の増大により、ヒストンの表面電荷が、負電荷を帯びた状態となっている。また、DNA のような高分子の場合、カウンターイオンが連鎖しているため、多価のカウンターイオンの場合より、電荷符号反転の現象が顕著に表れる。

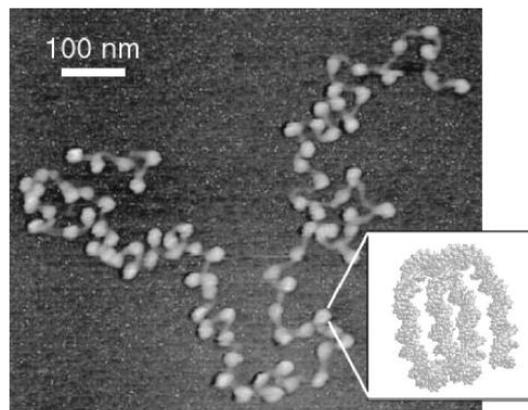


図 1.14 クロマチンの構造[7]

また、DNA と正電荷を帯びた巨大なコロイド粒子の場合、正電荷を帯びたコロイド表面に、DNA 自体の電氣的反発の影響で、間隔を空けて配置しながら、表面を負電荷で覆っている(図 1.15)。

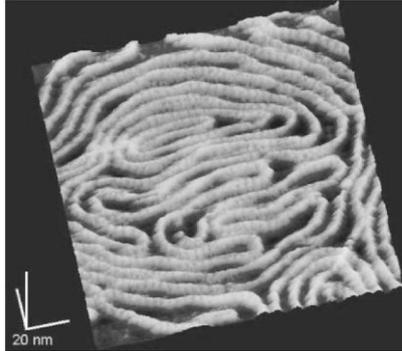


図 1.15 DNA が吸着した巨大なコロイド粒子表面[7]

さらに、電荷符号反転特性の実験結果として、一本鎖 DNA 添加による 120nm サイズの正電荷を帯びたラテックス粒子の移動度グラフを図 1.16 で示す。このグラフから、負電荷を帯びた DNA の添加量を増加させると、電荷符号反転が生じていることが分かる。

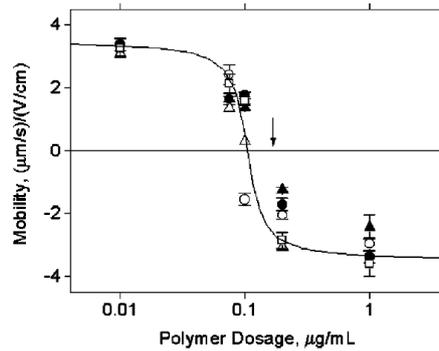


図 1.16 カチオン高分子添加によるアニオン粒子の電荷符号反転グラフ[7]

この電荷符号反転現象について、以下のような見解がある。図 1.17(a)の場合、正電荷である高分子は、カウンターイオンを帯びた表面に完全に配置できる中和状態になるが、図 1.17(b)の場合、正電荷を帯びた高分子は、カウンターイオンを帯びた表面において、不完全な結合となり、正電荷が余る。このことで、電荷符号反転が、顕著に生じると考えられている。

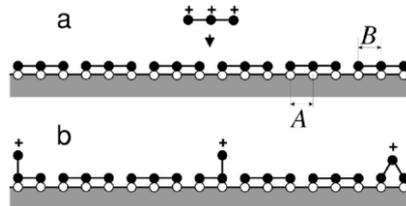


図 1.17 電荷符号反転の仕組み[7]

1.6 本研究の目的

統計物理のフロンティア分野である強結合・強相関系について、異なる2つの領域を紹介する。量子揺らぎが優勢である低温域では、高温超伝導に代表される強相関電子系に注目が集まっている。一方、室温状態の場合、原子系での可視化に位置づけられるコロイド系では、プラズマに代表されるクーロン相互作用による強結合に注目が集まっている。この強相関、強結合は、統計物理学にとって残された課題である。

強結合における代表例を2つ示す。まず、低い溶液濃度で、同符号のコロイドが、ある規則性をマクロに構成する希薄コロイドの結晶化の形成がある。次に、異符号のコロイド粒子間で、電荷を帯びた粒子に、多価のカウンターイオンを帯びたイオンや、高分子が結合する電荷符号反転の現象がある。本研究は、コロイド粒子間の強結合における電荷符号反転について検証する。

電荷符号反転に対する基礎実験は、理論やシミュレーションと比べてはるかに少ない。クロマチンが、電荷符号反転の典型的な例であり、DNA とヒストンの電荷的相互作用で成り立っているが、このペアを色々と探求することで、新たな構造をもった材料作成が可能となる。そして、ペアとなる材料として、固体領域内にある金属微粒子や高分子コロイド、液体領域内にあるエマルジョン、気体領域であるマイクロバブルの3領域がある。そこで、本研究では、2つの物体について追及する。まず、本研究で利用する暗視野顕微鏡装置及び電気泳動装置において、電荷符号反転が生じ、電荷符号反転をデータ化できるかの妥当性を、シリカ粒子を使って確認する。次に、気体領域であるマイクロバブルの電荷符号反転特性を調べる。また、マイクロバブル自体の問題については第5章で詳細を述べる。次に、“Colloidal molecules”という分野は、各々のコロイド間におけるメゾスケールの自己集積化による構造形成である。この分野の例として平衡状態による自己集積化したクラスター形成が挙げられる。そこで、ヒストン溶液内で、自己集積化したヒストンクラスターが生じるかを確認する。このクラスター形成についてタンパク質では議論が多い。詳細は、第4章で取り扱う。最後に、アニオン性高分子である DNA を添加した時の自己集積化したヒストンクラスターの電荷符号反転特性を評価する。

1.7 本研究の構成

第4章では、リゾチームなどの球状タンパク質が、自己集積化するクラスター形成には議論がある。そこで、第4章では、リゾチームより表面電荷が大きいヒストンを利用して、暗視野顕微鏡、動的光散乱装置、FE-SEM、電気泳動装置を用いて、クラスター形成が行われるかを調べた。

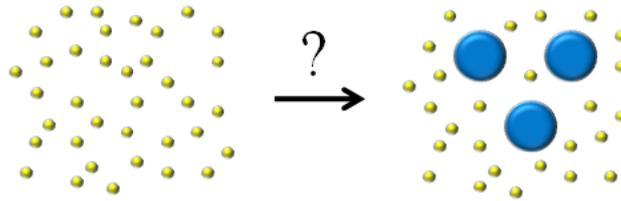


図 1.18 ヒストンのクラスター形成

第5章から第7章では、コロイド粒子と紐状高分子における電荷符号反転の現象を、3つの試料を利用して、電気泳動装置で検証し、その実験値から考察した。

1つ目は、第5章で述べるカチオン性の高分子である PAH 添加によるシリカ粒子の電荷符号反転を利用して、本章で示した電荷符号反転の現象が同じように生じるかを確認する。

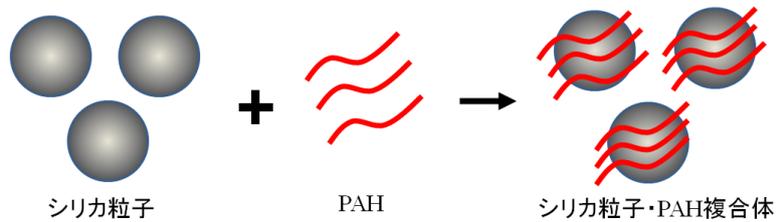


図 1.19 PAH 添加によるシリカ粒子の電荷符号反転特性の概図

2つ目は、第6章で述べる PAH 添加によるエアロゾルの一つであるマイクロバブルの電荷符号反転を調べ、シリカ粒子の場合と比較する(図 1.20)。

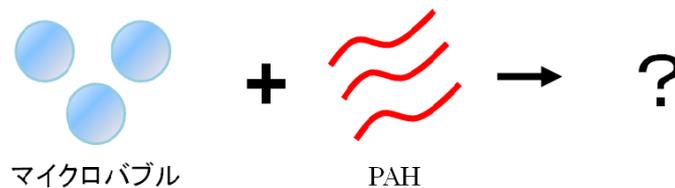


図 1.20 PAH 添加によるマイクロバブルの電荷符号反転特性の概図

3つ目は、第7章で述べるヒストンと負電荷の高分子である DNA 添加によるヒストンの電荷符号反転からヒストンの電荷的特性を評価する(図 1.21)。



図 1.21 DNA 添加によるヒストンの電荷符号反転特性の概図

第2章 装置

2.1 暗視野顕微鏡

暗視野顕微鏡は、バックグラウンドを暗くすることで暗視野状態をつくり、レーザー照射によって、微粒子による光散乱が起これ観測可能となる(図 2.2)。本研究では、この暗視野顕微鏡画像から、拡散係数を求め、コロイド粒子の粒径算出を行った[J2]。

コロイド粒子は、図 2.1 で示すように、溶液中で、ランダムな運動であるブラウン運動を行っているので、ランダムウォークの統計性を調べる。



図 2.1 コロイド粒子のブラウン運動のイメージ図

このランダムウォークに対しての時間 t における変位の二乗平均は、 $\langle x^2 \rangle$ は、一次元ならば、

$$\langle x^2 \rangle = 2Dt \quad (2.1)$$

で表せる。そして、媒質中でコロイド粒子が運動すると、摩擦（抵抗）力が生じる。粒子が滑らかで速度が小さい場合、摩擦力は速度に比例し、

$$F = f\nu \quad (2.2)$$

と示せることができる。ちなみに、 f は摩擦係数、 ν は速度である。

また、拡散係数と摩擦係数は運動エネルギーと、

$$Df = k_B T \quad (2.3)$$

の関係式となり、 $k_B T$ は粒子当たりの並進運動エネルギーの目安、 k_B はボルツマン定数である。ここで球状粒子の f はストークス則

$$f = 6\pi\eta r \quad (2.4)$$

となり、 a は流体的力学半径、 η は溶液の粘度を示していて、上記に示す式を組み合わせると、コロイド粒子の拡散に対するストークス-アインシュタイン式は、

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta a} \quad (2.5)$$

と求めることができる。

2.2 電気泳動装置

暗視野顕微鏡で観察した画像を、電気泳動装置を利用して、電気特性を調べる。その電気特性を調べるにあたり、ゼータ電位と真の泳動速度について述べる。ちなみに、暗視野観察時のガラスセルは、0.75 mmの厚さをもち、電極間距離は、9 cmである。

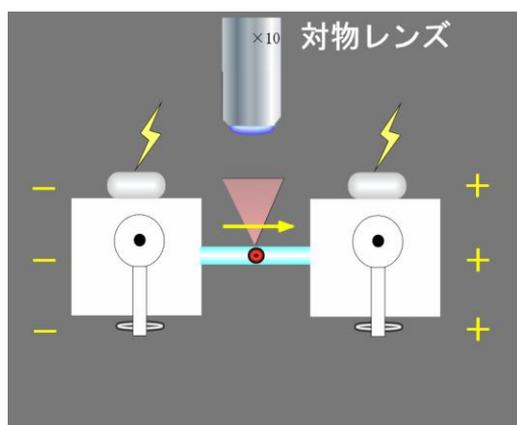


図 2.2 電気泳動システムの概要図

2.2.1 ゼータ電位の算出式[J5]

ゼータ電位は、一般に流動電位の測定や電気浸透効果を考え計測する。ゼータ電位測定には、顕微鏡電気泳動法、回転回析格子法、レーザー・ドップラー電気泳動法などがある。そのなかで、顕微鏡電気泳動法についての詳細を述べる。顕微鏡電気泳動法には、光学顕微鏡による観察する方法と、粒子径が小さい場合は、レーザー照射による散乱光の暗視野顕微鏡観察する方法がある。本研究は、後者である。以下に、コロイド分散系の直接電気泳動の測定方法を示す。

まず、キャピラリー内での真の電気泳動速度の算出について説明する。電気泳動測定を行う場合、キャピラリー内で大きな問題が生じる。それは、印加電場によって、電気浸透による溶液の流動が生じる現象、つまり、電気浸透効果が生じる。この効果の影響が無視できないほど大きい時がある。そのため、測定時に十分な考慮が必要で、通常、セルは閉管系を利用するため、液の還流が生じ、

定常状態ではセルの中央部と壁の表面で逆向きの流れが存在する。そのため、浸透流が、放物線の速度分布となる(図 2.3)。

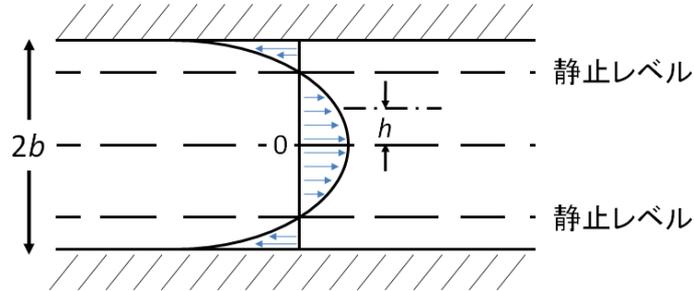


図 2.3 キャピラリーセルの中での浸透流

まず、半径 b のキャピラリーでは、液の流速 v とセルの中心から測った深度 h との関係は、

$$v = v_b \left(\frac{2h^2}{b^2} - 1 \right) \quad (2.6)$$

で表わされ、 v_b は壁面での浸透流の速度である。

$$h = \frac{b}{\sqrt{2}} = h_s \quad (2.7)$$

において電気浸透流の速度はゼロとなり、この位置 h_s は静止レベルと呼ばれ、キャピラリーセルの場合、真の電気泳動速度は、この位置で粒子の泳動速度を測定することによって得られる。

次に、平板セルでの真の電気泳動速度の算出について説明する。平面セルでの測定は、キャピラリーの問題と同様に、電荷印加によるガラス壁面での電気浸透効果が生じている。よって、電気浸透流によって溶液が流動する時の流れ u_{osm} と、コロイド粒子の真の電気泳動移動度 u の和が、顕微鏡で観察できる見かけの粒子の泳動移動度 u_{app} となるため、以下の式が成り立つ。

$$u_{app} = u + u_{osm} \quad (2.8)$$

はセルの深さ h で放物線状に変化し、 $k=(\text{セルの幅}/\text{セルの深さ}) \gg 1$ の場合、次の式となる。

$$u_{osm} = \frac{u_0}{2} \left(\frac{3h^2}{b^2} - 1 \right) \quad (2.9)$$

ここで、 b はセルの厚さの $1/2$ 、 u_0 は壁面 ($h=\pm b$) での電気泳動移動度を示す。そして、 $u_{osm}=0$ を示す静止レベル h_s では、 u_{app} と u が一致し、 u を簡単に求めることができる。その時の平板セルでの静止レベルは、

$$h_s = \pm \frac{b}{\sqrt{3}} = \pm 0.577b \quad (2.10)$$

となり、 k (=セルの幅÷セルの厚み)がいろいろな値をとる場合の h_s は、駒形により以下の式で与えられている[9]。

$$\frac{h_s}{b} = \pm \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{128}{\pi^5 k}} \quad (2.11)$$

2.2.2 真の泳動速度の算出方法

本研究における電気泳動装置を利用して、真の泳動速度を算出する方法を述べる。

まず、暗視野状態で電気泳動を横から観察し、数秒おきに各点をプロットすると図2.4のように、電荷コロイド粒子を追跡する。これを数値化したデータを保存する。

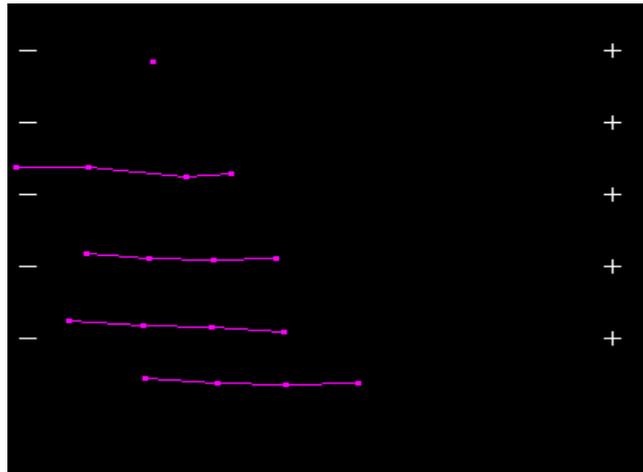


図2.4 電気泳動における粒子の軌跡

この作業を、各々のセルの位置で測定する。その結果、先ほど示した電気浸透流の影響を受けるため、速度分布の放物線は、図2.5となる。ちなみに、この泳動速度分布グラフは、ヒストンに対応するものである。これを理論式に当てはめることで、泳動速度を求めることができる。詳細は以下の通りである。

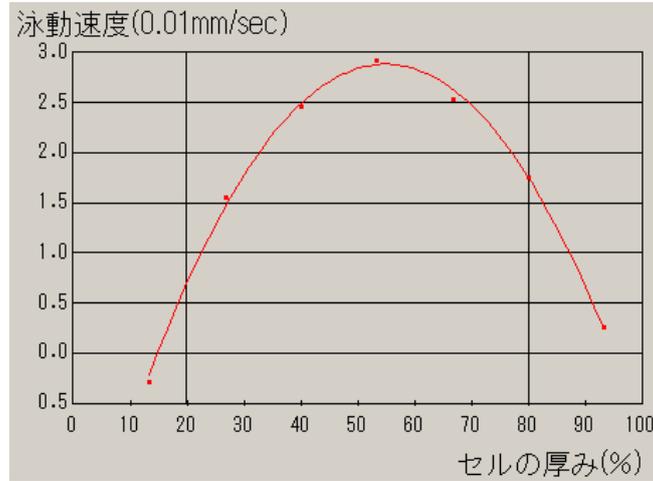


図2.5 泳動速度分布グラフ

我々は、図 2.5 で示した放物線を以下の方法で利用して、真の泳動速度を算出する[10]。真の泳動速度には以下の式が成り立つ。

$$u_{\text{app}} = u_{\text{osm}}(y) + u = \frac{3}{2d'^2} u_{\text{eo}} y^2 - \frac{e}{2} u_{\text{eo}} + u \quad (2.12)$$

ちなみに、 u_{app} が見かけの泳動速度、 u_{osm} が電気浸透流によって溶液が流動する時の流れ、 u が真の泳動速度を示している。本研究において得た放物線をフィッティングした一般式を平方完成すると、

$$f(x) = ax^2 + bx + c = a \left(x + \frac{b}{2a} \right)^2 - \frac{b^2}{4a} + c \quad (2.13)$$

式(2.12)と式(2.13)は、一致するので、係数比較をすると、

$$a = \frac{3}{2d'^2} u_{\text{eo}} \quad (2.14)$$

$$-\frac{b^2}{4a} + c = -\frac{e}{2} u_{\text{eo}} + u \quad (2.15)$$

また、 d'^2 、 K 、 k はそれぞれ以下の式で示される。

$$d'^2 = \frac{Kd^2}{2} \quad (2.16)$$

$$K = 2 - \frac{384}{\pi^5 k} \quad (2.17)$$

$$k = \frac{b}{a} \quad (2.18)$$

ちなみに、 b は、ガラスセルの幅、 a は、ガラスセルの高さを示す。
式(2.14)、式(2.15)より、真の泳動速度 u は、

$$u = a \times \frac{d'^2}{3} e - \frac{b^2}{4a} + c \quad (2.19)$$

となり、 $\frac{d'}{3}e$ を、式(2.16)、式(2.17)、式(2.18)を使って変形すると、

$$\frac{1}{3} \times \frac{Kd^2}{2} \left(\frac{6}{K} - 2 \right) = d^2 \left(1 - \frac{K}{3} \right) = d^2 \left\{ \frac{1}{3} + \frac{384}{3\pi^5(b/a)} \right\} = d^2 \left\{ \frac{1}{3} + \frac{128}{\pi^5(b/a)} \right\} \quad (2.20)$$

となり、ガラスセルの内部の幅 a が 0.75mm、高さ b が 10mm、ガラスの中央部 d は、0.375mm を代入すると、(幅の半分かつ高さの半分と考えても、 b/a の値は変化しない。)

$$\frac{d'^2}{3} e = (0.375)^2 = \frac{1}{3} + \frac{128}{\pi^5(10/0.75)} \approx 0.05 \quad (2.21)$$

よって、真の泳動速度は、

$$u = 0.05a - \frac{b^2}{4a} + c \quad (2.22)$$

と求めることができる。

2.3 動的散乱装置^[J6]

2.3.1 動的散乱の仕組み

動的散乱法は、比較的簡便で短時間に測定できるため、高分子溶液の拡散係数測定に利用される標準的な方法である。高分子溶液に対する動的散乱実験の装置は、図 2.6 で模式的に示す。異なる濃度 c の測定溶液を、円筒セルに入れ、散乱角度が調整できる回転ステージに設置する。光源から発せられた光である入射光は、ブラウン運動しているコロイド粒子が存在すれば、散乱光の強度検出器により測定される。入射光は、通常、その面に垂直に振動する偏光を用い、散乱体積 V は、2枚のスリットから見定める入射光の通過部分で $\sin\theta$ に逆比例する。また、本研究では、ヒストン溶液が希薄なため、角度依存性の結果が十分に得られなかった。

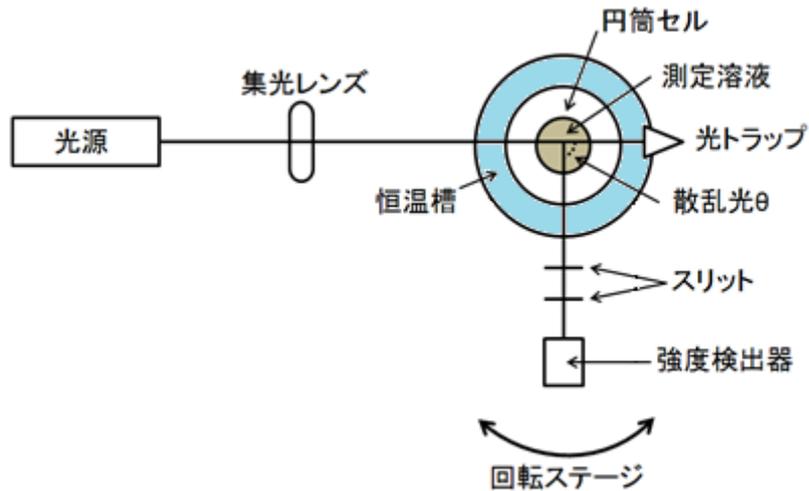


図 2.6 光散乱装置の模式図

2.3.2 動的光散乱の原理

光は、電磁波の一種である。磁場の時間変化により、電場が発生したり、電場の時間変化で磁場が生じたりするため、波として伝搬する。そして、この入射光の波が、溶液中のブラウン運動するコロイド粒子に衝突すると、新しい電磁波である光が生じる。この光は、四方八方に放射される。これを散乱光と呼ぶ。溶液中にあるコロイド粒子に、入射光が衝突しない限り、散乱光は生じないので、コロイド粒子のない液体では、ほとんど散乱されず透過する。そのため、希薄であっても散乱強度が大きいコロイド粒子なら、全ての散乱光のメインとなるので検知できる。この検知時における周波数変化は、入射光によるスペクトルが、ブラウン運動しているコロイド粒子に衝突し、ドップラーシフトし、散乱光の光スペクトルが幅をもつ。

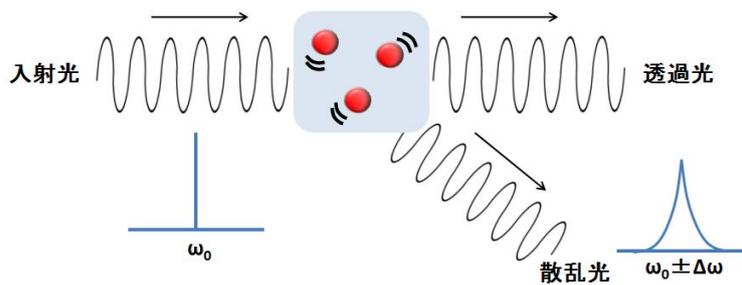


図 2.7 入射光と散乱光

次に、コロイド粒子のブラウン運動に起因する散乱光強度の不規則的な時間変化 $I(t)$ を説明する。この不規則な変化を数値化するため、次式で定義される自己相関関数 $g(t)$ を導入する。

$$g(t) = \frac{\langle I(t+t_0)I(t_0) \rangle_{t_0}}{\langle I(t_0) \rangle_{t_0}^2} \quad (2.24)$$

ここで、 $\langle \dots \rangle_{t_0}$ は基準となる時刻 t_0 に関する長時間における平均操作を意味する。

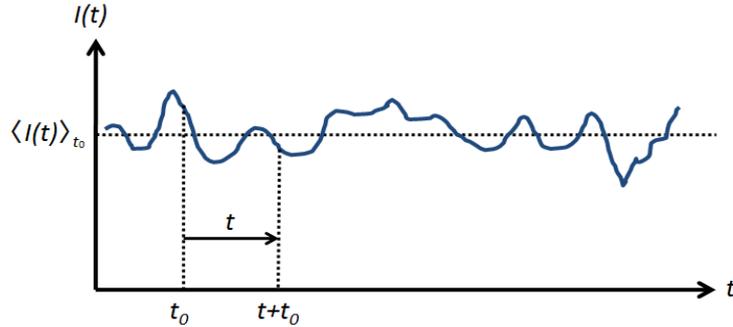


図 2.8 時間変化による散乱強度測定グラフ

遅延時間 t が、基準時間 t_0 よりはるかに離れていると、 $I(t+t_0)$ と $I(t_0)$ との間で相関が無くなり、独立に平均できるようになるので、 t がはるかに大きくなると $g(t)$ は 1 に漸近できる。その一方、 $t=0$ では

$$g(0) = \frac{\langle I(t_0)^2 \rangle_{t_0}}{\langle I(t_0) \rangle_{t_0}^2} \quad (2.25)$$

となり、1 より大きい値となる。図 2.8 は、 $\langle I(t) \rangle$ より値が大きい時は、照射領域内にコロイド粒子が多く、小さい時は、コロイド粒子が少ないことを示している。ここで、 k とは、散乱ベクトルを示し、溶液中での光の波長 λ/\tilde{n}_0 (ただし、 \tilde{n}_0 は、溶媒の屈折率) を用いると、

$$k = \frac{4\pi\tilde{n}_0}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (2.26)$$

と表すことができ、散乱角 θ と関係づけられる。

そして、この相関関数を時間変化でグラフにすると、 c 及び k が十分小さい条件で、 $g(t)$ は次のように書ける。

$$g(t) = 1 + \beta \exp(-2Dk^2 t) \quad (2.27)$$

ここで、 β は実験条件で決まる定数、 D は拡散係数で、図 2.9 に $g(t)$ を表すグラフを示す。そして、このグラフから、照射領域内の平均滞在時間 τ を数値化できる。この τ を緩和時間と呼ぶ。緩和

時間は、コロイドの粒径と相関関係がある。それは、粒径が大きいコロイドでは、拡散速度が遅く、照射領域内に長く滞在するため、緩和時間が長くなる。反対に、粒径が小さいコロイドでは、拡散速度が早いから、緩和時間が短くなる。このように、平均化した値を示すので、顕微法にはない利点があるが、ほこりなどの粒径が大きな物質が溶液中に混入すると、正しい測定値が表示されない。

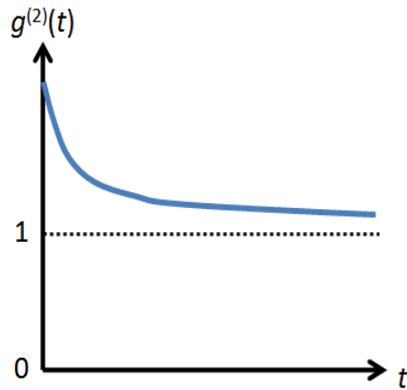


図 2.9 時間変化による相関関係グラフ

(2.27)より

$$\frac{g(t)-1}{\beta} = \exp(-2Dk^2t) \quad (2.28)$$

となり、

$$\ln\left\{\frac{g(t)-1}{\beta}\right\} = \ln\{g(t)\} - \ln\beta = -2Dk^2t \quad (2.29)$$

が得られる。縦軸 $\ln\{g(t)\}$ 対横軸 k^2t のグラフをとると、拡散係数 D が勾配に關係する (図 2.10)。

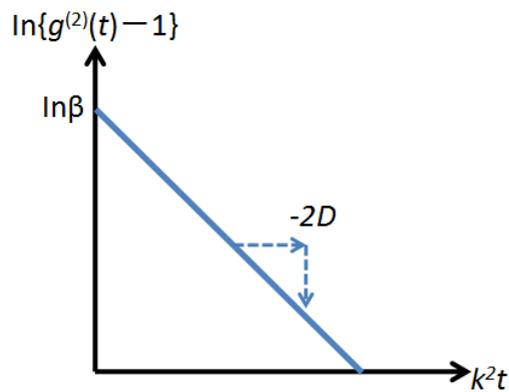


図 2.10 拡散係数の算出グラフ

また、動的光散乱法から求めた拡散係数 D は、ブラウン運動で述べたストークス・アインシュタイン式(2.5)に代入することで、流体的力学半径 a を算出できる。

本研究では、緩和時間の分布を示すために、散乱光強度の自己相関関数を CONTIN で分析し、その分布を ALV-5000/E(ALV、Langen)の解析ソフトで数値化した。

2.4 FE-SEM

FE-SEM は、電界放射型走査電子顕微鏡(Field Emission Scanning Electron Microscope)の略称である。本研究では、日本電子株式会社製電界放射走査電子顕微鏡を利用している。前処理として、試料を金蒸着する。次に、真空中で、試料を電子線で X-Y の二次元方向に走査を行うことで、試料表面から発生する二次電子などの信号を検出する。この信号を、ブラウン管上に二次電子像を映し出すことで、試料表面の形態、微細構造を観察が可能となる。FE-SEM の場合、フィールドエミッション型で、電子線を極細く絞れることができ、電流を多く流せるため、通常の SEM に比べて高輝度、高分解能な像観察が可能で、付属のエネルギー分散型 X 線分析装置を用いて組成元素の分布、定性、定量の分析もできる。

2.5 分光光度計

分光光度計は、日立社製の U-3900/3900H で、ブラッドフォード法[11]で染色したヒストン溶液の吸光度を測定するために利用した。ブラッドフォード法について以下に示す。

ブラッドフォード法は、色素結合法により、タンパク質を染色するので、染色されたタンパク質の濃度測定に有効である。また、発色法の中で最も高感度で、色素がタンパク質と 5 分ほどで反応し、一度反応すると発光が安定しているので、試料数が多い場合でも利用でき簡便である。ただし、1 時間ほどで色素とタンパク質の複合体が沈殿することや、界面活性剤や DNA の混合液では利用できないことなどが短所である。

ブラッドフォード法を行うに際して、CBB (クマシーブリリアントブルー) G-250 という色素を利用する。CBB は、赤紫色から青色に変化する。この変化を利用して、タンパク質の濃度を測定できる。また、タンパク質の濃度が高い時は、より濃い青色を示し、濃度が低くなるごとに赤紫色に染色される。この色の変化を分光光度計で分析し、縦軸に波長 595nm の吸光度、横軸にタンパク質の濃度をプロットし、検量線を作成する。

本研究では、球状タンパク質であるヒストン溶液をブラッドフォード法で染色し、ヒストンの濃度を計測した。詳細は以下の手順である。

まず、ブラッドフォード試薬の作成方法を示す。CBB G-250 の粉末 20mg を、95%エタノール 10ml に溶かし、マグネチックスターラーで攪拌した。CBB の色素が溶けたら、85%のリン酸溶液 20ml を加えてさらに攪拌した。次に、水を加えて 200ml にして、さらに 1 時間攪拌し、ろ紙を使ってろ

過することで、試薬は完成する。試料作成後、1日静置して、試薬が濃い青色に既に染まっていた場合は、作成中に異物が混入して染色された後なので、試薬を作り直す必要がある。

ブラッドフォード試薬の作成後、検量線をとる。今回は、ヒストン溶液の濃度 40mg/l、80mg/l、200mg/l、400mg/l を 10ml 作成し、ブラッドフォード試薬を 500 μ l 注入して、分光光度計で、波長 595nm の吸光度を各々測定する。測定して、得られた検量線が、図 2.11 であり、比例の関係にあるので、これを利用して、未知のヒストン濃度を推定できる。

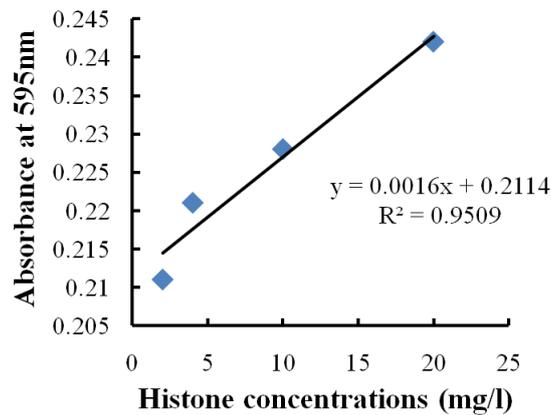


図 2.11 ヒストンの検量線

2.6 マイクロバブル発生装置

マイクロバブルは、オーラテック社製マイクロバブル発生装置(OM4-GP-040)を用いて発生させる。マイクロバブル作成時は、水圧を 0.25~0.27MPa に固定する。マイクロバブル発生装置から作成されるマイクロバブルは、インバーター制御での流量安定と加圧溶解方式により、気泡直径の平均 1 μ m とされている。しかし、Ushikubo らの論文では、200nm から 300nm と示されているため、実験環境や発生過程における温度変化などで粒径が変動する可能性がある[12]。また、従来のマイクロバブルでは、界面活性剤などを添加しない場合、すぐに消失する[13]。しかし、本装置では、時間的安定性を示している。詳細は、第 6 章で示す。また、この結果は、同じ装置を利用し Ushikubo ら論文から示唆されている[12]。

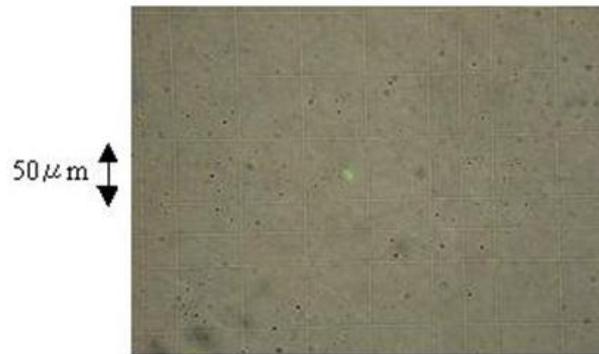


図 2.12 光学顕微鏡で観察したマイクロバブル
オーラテック社の HP より

2.7 その他の装置

遠心分離機は、クボタ社製の型番 2410 で、50ml のコニカルチューブに、濃度 0.4g/l のヒストン溶液 50ml を注ぎ、653G、6 時間の遠心分離を行い、10ml の上澄み液を抽出した。この作業で、ヒストンオクタマーのみが存在する溶液を作成できる。この溶液から、ヒストンのクラスター形成を確認する。

pH メーターは、METTLER TOLEDO 社製のセブンマルチで、シリカ粒子・PAH 複合体を含む溶液と、ヒストン溶液、マイクロバブル溶液及びマイクロバブル・PAH 複合体を含む溶液の pH を測定するために利用した。

第3章 試料

3.1 ヒストンコア(ヒストンオクタマー)

ヒストンは、円柱のような形をとり、半径 5nm 程度で、ヒストンコアは、H2A、H2B、H3、H4 が、各々二つずつ結合した八量体 (オクタマー) を形成している。また、ヒストンコアは、220 個の塩基性タンパク質を多く含むため、正電荷を帯びている。その詳細として、ヒストンコアの構造外部に 60% (+132 価)、構造内部に 40% (+88 価) の正電荷が存在する。さらに、ヒストンは、リン酸基由来の負電荷をもつ DNA が、約 146bp 塩基対巻きつき、ヌクレオソームを形成し、ヌクレオソームは集結し、クロマチン、最終的に染色体となる [8]。ヌクレオソームは、転写制御などのエピゲノムの役割として注目されている。エピゲノムの役割である転写制御の代表例として、ヒストンのメチル化、ヒストンのアセチル化について述べる(図 3.1)。

ヒストンの表面がアセチル化されると、ヒストンの表面電荷が中和され、負電荷である DNA と解離する。この時、DNA は、RNA ポリメラーゼによって転写される。つまり、ヒストンのアセチル化は、転写を促進する。一方、ヒストンがメチル化されると、DNA と結合する。よって、ヒストンのメチル化は、転写を制御する。このエピゲノムの役割は、転写機構などの遺伝子機構における後発的な働きで、支障が生じると、癌化や奇形、代謝異常など生体活動における重大な疾患を抱える可能性がある [7]。

本研究では、仔牛胸腺から抽出されたヒストン粉末 (Wako 社製、商品番号 595-05261) を利用している。ヒストン溶液の濃度は、2mg/l から 0.4g/l の範囲で利用する。また、純水中のヒストン溶液の pH は、本研究における濃度変化では、6.8~8.2 である。



図 3.1 ヒストンのエピゲノムの役割

3.2 シリカ粒子

直径 1 μ m で、Duke Scientific Corporation 製である。シリカ粒子は、負電荷を帯びるコロイド粒子

で、カチオン性高分子の添加による電荷符号反転特性を調べることに利用する。また、電荷符号反転特性を、エアロゾルであるマイクロバブルと比較するため、数密度を以下のような計算をして揃える。

シリカ粒子を含む原液の数密度は、シリカ粒子の個数である

$$\rho = 2\text{g/cm}^3 = 2 \times 10^6 \text{g/m}^3 \quad (3.1)$$

に、シリカ粒子の表面積をかけ、この溶液におけるシリカ粒子と同じ体積に、シリカ粒子が何 g 存在するかを求めると、

$$\rho \times \frac{4}{3}\pi r^3 = \frac{4}{3} \times 3.14 \times (5 \times 10^{-7})^3 \times 2 \times 10^6 = 1.047 \times 10^{-12} \text{g} \quad (3.2)$$

と計算できる。そして、重量パーセント(2%=0.02g/ml)を利用し、数密度は、

$$\frac{0.02}{1.047 \times 10^{-12}} = 1.91 \times 10^{10} \text{number/ml} \quad (3.3)$$

と算出し、シリカ粒子の原液の数密度は、 1.91×10^{10} 個/ml となった。これを、暗視野顕微鏡下での画像から分かるマイクロバブルの数密度と一致させるため、20000 分の 1 に希釈する。その結果、シリカ粒子の数密度を、 9.6×10^6 個/ml に調整して、実験に利用した。

3.3 ポリアリルアミンハイドロクロライド (PAH)

2 種類の分子量の違うポリアリルアミンハイドロクロライド(Poly(allylamine hydrochloride), PAH)を使用した。それぞれの平均分子量は 56000(鎖長が長い)、15000(鎖長が短い)である。分子量 56000(鎖長が長い)の PAH の濃度は、0.04mg/l~40mg/l で、分子量 15000(鎖長が短い)の PAH の濃度は、0.004mg/l~40mg/l である。

PAH の特性は、正の電荷を持ち、化学反応性の大きな第 1 級アミノ基を側鎖に含む直鎖のオレフィン系重合体であり、水によく溶け、水の中では正に荷電する。さらに、結晶構造的には、非結晶性であり、強い吸湿性と吸水性を示す。

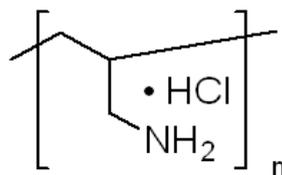


図 3.2 PAH 構造式

シグマアルドリッチの HP より

3.4 マイクロバブル (Microbubble, MB) [J8]

マイクロバブルとは、直径 50 μm 以下の微細気泡のことを示す。また、マイクロバブルは、食品・農業分野、環境分野、医療分野など様々な分野への応用が期待されている。マイクロバブルの特性は、上昇速度、自己加圧効果、表面電位特性、自己圧壊が挙げられる。

1つ目は、上昇速度が遅いことである。マイクロバブルは、通常の気泡と違い気泡体積が微細であるため、水中で長い間滞在する。

2つ目は、自己加圧効果である。界面で、表面張力が作用し、その表面を小さくするように働く。その力は、球体の界面を持つ気泡の場合、内部の圧縮力となる。そして、微細気泡では、圧縮力がさらに高まり、理論上、無限の圧力が生じる。この加圧効果により、水中に溶解する。サイズ別の概図は図 3.3 に示す。



図 3.3 サイズ別によるバブルの形状変化

3つ目に、表面電位特性である。水中のコロイド粒子が帯電していると同様に、マイクロバブルも電荷を帯びている。そのメカニズムについては、まだ不明であるが、気液界面における水分子群のクラスター構造が、水本体のものとは異なる可能性が高い。水のクラスター構造は、水分子と、これが電離して生じたわずかな量の H^+ と OH^- から構成されている。構造的な理由により、 H^+ と OH^- が、界面に集まりやすく、結果的に界面を帯電させている。また、マイクロバブルの表面では、 OH^- が多いため、純水中ではマイナスに帯電している [13,14]。その上、マイクロバブルの溶媒変化による電荷特性は、以下のような論文の報告がある。

pH が低いとプラスの電荷に反転することや [14]、 NaCl 、 MgCl_2 添加により、 ζ 電位が低下すること [14,15]、 AlCl_3 添加と pH 変動による電荷反転の研究 [15] が行われている。さらに、界面活性剤を添加し、その濃度変化による電荷特性の研究も行われている [16]。

以下に示す図 3.4 は、マイクロバブルの pH 依存性を示したグラフである [14]。本研究におけるマイクロバブルを含んだ水溶液を、pH メーターで計測した。その結果、マイクロバブル水溶液は、pH6.5 ~ pH7.0 を示した。このことから、本研究におけるマイクロバブルは、負電荷を帯びていると判断できる。

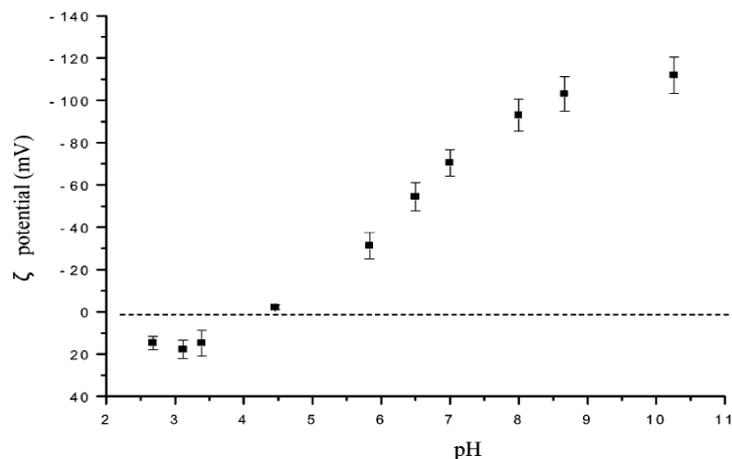


図 3.4 pH 変化によるマイクロバブルの表面電荷特性[14]

最後に、自己圧壊である。圧壊とは、超高压で超高温な領域を形成し、難分解性の有害化学物質などを強力に分解することで、マイクロバブルの自己加圧効果を利用している。また、マイクロバブルは、物理的な刺激を与え、気泡径を急激に縮小させ、圧壊現象を生じさせることが可能である。さらに、気泡として存在するため、気体の特性や気液界面に存在する電荷の効果も活用できる。

3.5 DNA

DNA (デオキシリボ核酸、deoxyribonucleic acid) の基本構成因子は、核酸塩基 (アデニン、チミン、シトシン、グアニン) とデオキシリボースとリン酸から構成されるヌクレオチドである。(図 3.5)。デオキシリボースの OH 基とリン酸が、ホスホジエステル結合して、ヌクレオチドが伸長し (図 3.6)、一本鎖ができる。この一本鎖が、相補的な水素結合により (図 3.7)、二重らせん構造を形成している。より粗視化すると、リン酸が乖離して、負電荷を持つ紐状の物質である。また、生体的機能として、DNA は、遺伝情報を保存、伝達する働きをもち、材料的視点からは、フィルムや、バイオセンサー、半導体材料としても注目されている[17-20]。

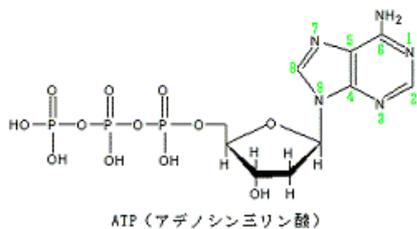


図 3.5 スクレオチドの一種の ATP

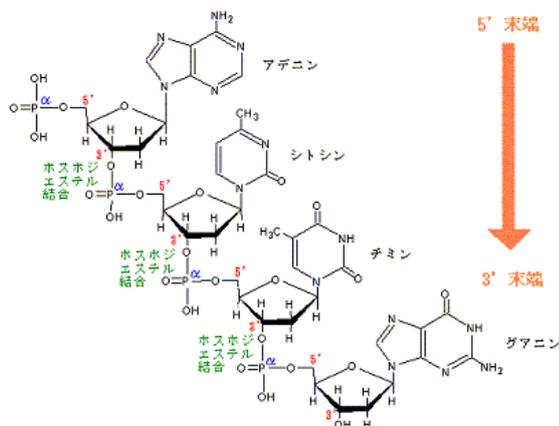


図 3.6 スクレオチドの伸長

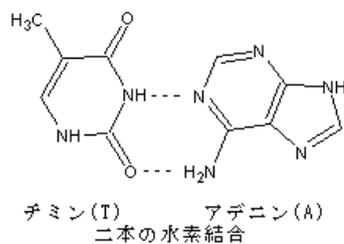
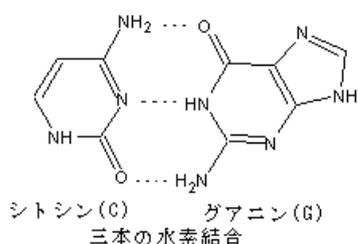


図 3.7 水素結合による相補的な核酸塩基

本研究では、 λ DNA、 ϕ DNA、サーモン DNA の 3 種類を、ヒストンの電荷符号反転特性の評価に利用した。詳細は以下の通りである。 λ DNA は、Bacteriophage λ c1857Sam7 由来で、約 48502 塩基対の鎖長をもち、タカラバイオ社製である。本研究では、 $45\mu\text{g}/\text{l} \sim 510\mu\text{g}/\text{l}$ の濃度で扱った。また、 ϕ DNA は、Bacteriophage ϕ X174am3 由来で、約 5386 塩基対の鎖長で、タカラバイオ社製である。本研究では、 $45\mu\text{g}/\text{l} \sim 510\mu\text{g}/\text{l}$ で利用した。そして、サーモン DNA は、Wako 社製 (商品番号 047-17322)、鮭精子由来である。また、ゲル電気泳動を行ったところ、約 100 塩基対のバンドが見られるが、電気泳動で計測できない鎖長の長い DNA が存在する可能性があるため、塩基対は不明である。また、サーモン DNA 濃度は、 $3.0 \times 10^{-4} \text{g}/\text{l} \sim 2.0 \times 10^{-3} \text{g}/\text{l}$ で測定した。

3.6 その他の試料

粒径 180nm のカチオン性粒子である Aminated Polystyrene は、Bang Laboratories 社製で、ヒストンクラスターの数密度の見積りに利用した。

クマシーブリリアントブルー(Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250)は、タンパク質を染色される色素で、Wako 社製を利用した。

粒径 302nm のアニオン性のポリスチレン微粒子は、セラダイン社製で、第 4 章で行うフィルター

依存性のサンプルとして利用した。

Invitrogen 社製の 1 M トリス塩酸溶液は、pH7.5 と pH8.0 に調整された 2 種類があり、ヒストンクラスターの溶媒変化における実験で利用した。

SDS は、ドデシル硫酸ナトリウム(sodium dodecyl sulfate)の略称で、親水基と疎水基をもつ界面活性剤である。また、Wako 社製で、ヒストンクラスターの溶媒変化における実験で利用した。

第 4 章 ヒストンのクラスター形成

4.1 本研究の目的

図 4.1 は、高分子添加による枯渇効果を利用して、長距離斥力を低下させた状態でのポリメチルメタクリレート（PMMA）の光学顕微鏡図である。この状態下において、PMMA がクラスターを形成している部分と、そのままモノマーとして存在する部分とが共存している。このように、コロイド粒子の場合、平衡状態におけるクラスター相が存在していることが分かる。

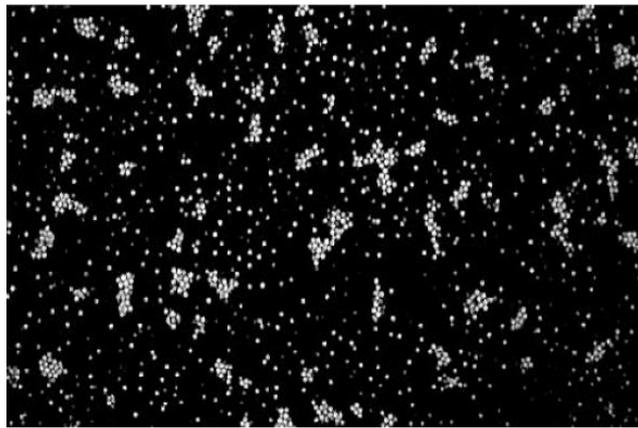


図 4.1 ポリメチルメタクリレートの光学顕微鏡図 [6]

この現象が、リゾチームのような球状タンパク質でも可能かを示したグラフが、中性子小角散乱法によるリゾチーム溶液の分析である(図 4.2)。このグラフは、ファーストピークで、リゾチームモノマー、セカンドピークで、リゾチームクラスターを表している。したがって、リゾチームのモノマーとクラスターが、それぞれ存在し、タンパク質でもクラスター形成していると考えられている。

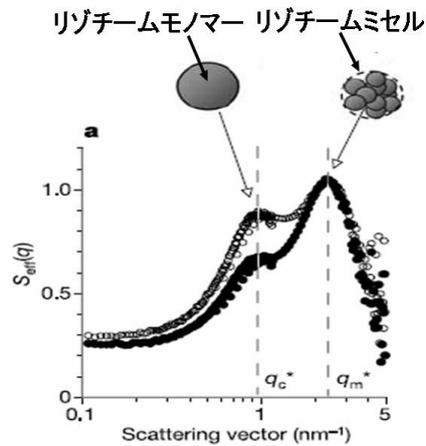


図 4.2 中性子小角散乱法によるリゾチーム溶液の分析 [6]

しかし、第一ピークと第二ピークの差が小さいことに起因して、リゾチームのクラスター形成の有無について議論が続いている [6,21-26]。そこで、本研究では、リゾチームより表面電荷が大きいヒストンを使って、タンパク質のクラスター形成の有無について、暗視野顕微鏡、動的光散乱、FE-SEM、電気泳動を利用して検証する。

4.2 ヒストンのメゾクラスター形成における実験方法

図 4.3 の Process A では、遠心分離前のヒストン溶液(Sample 1)を、動的光散乱装置で測定した後、1.2 μm フィルターにかけて、凝集物を除いたヒストン溶液(Sample 2)も、動的光散乱装置で測定した。

Process B では、フィルターをかけたヒストン溶液(Sample 2)に、DNA を添加して、電気泳動装置を利用し、電荷符号反転特性を調べた。この詳細は、第 7 章で説明する。

Process C では、Sample 1 を、遠心分離した後、上澄み液を抽出して、ヒストンオクタマーのみが存在する Sample 4 を作成した。この Sample 4 を、暗視野顕微鏡によって、時間変化によるヒストンメゾクラスターの形成を観察するとともに、分光光度計を利用して、ヒストンメゾクラスター形成時の濃度変化を測定した。

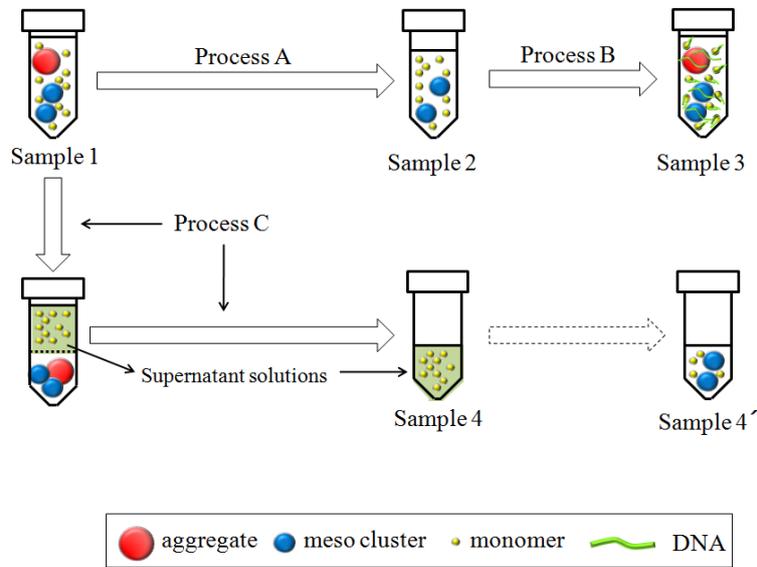


図 4.3 ヒストンメゾクラスター形成の実験プロセス

4.3 動的光散乱によるヒストン溶液の測定

まず、0.4g/lのヒストン溶液 (Sample 1) を、動的光散乱 (角度 20 度、測定温度 20°C) で測定した。その典型的な結果を、図 4.4 で示す。その典型的な結果を、図 4.4 で示す。このピーク値よりサイズを見積もると、13nm、88nm、3.8 μ m となった。これより、3つの緩和はそれぞれ、10nm サイズのヒストンオクタマー、88nm 程度のヒストンメゾクラスター、数 μ m 程度の凝集物を示していると考ええる。また、ヒストン溶液の濃度依存性が小さい。さらに、シグマ社製のヒストン溶液においても、ヒストンメゾクラスターは常に現れる。このことから、ヒストンオクタマー、ヒストンメゾクラスター、凝集物が共存していると推察できる。

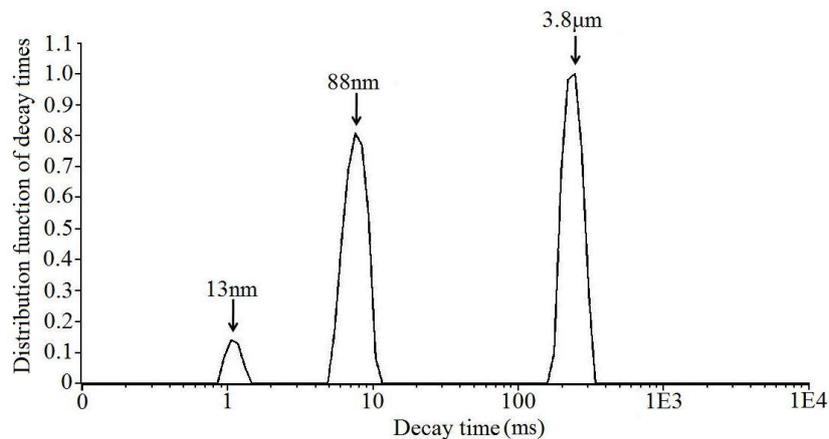


図 4.4 ヒストン溶液(sample 1)の動的光散乱装置による緩和

次に、1.2 μm フィルターをかけたヒストン溶液(Sample 2)を、動的光散乱装置によって測定した。その結果、測定する角度を 20 度、測定温度 20 $^{\circ}\text{C}$ とし、図 4.5 が得られた。このことから、数 μm の凝集物が除去でき、ヒストンメゾクラスターは、凝集物ではないことが分かる。

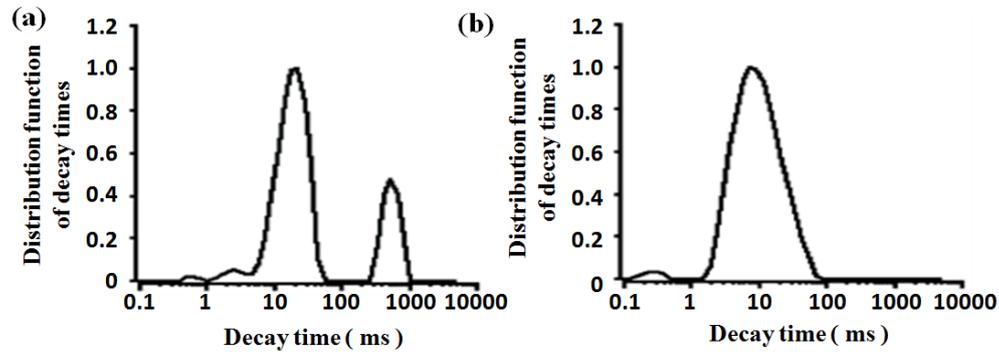


図 4.5 (a)フィルターをかけていないヒストン溶液の緩和
(b) 1.2 μm フィルターをかけたヒストン溶液の緩和

4.4 暗視野顕微鏡によるヒストン溶液の観察

まず、1.2 μm フィルターをかけた 0.08mg/l のヒストン溶液(Sample 2)を暗視野顕微鏡で観察した。図 4.6 に示すように、白く、星のように光るものが観察できた(図 4.6)。

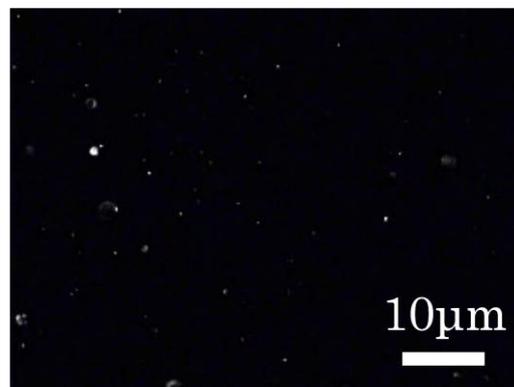


図 4.6 暗視野顕微鏡によるヒストンクラスターの観察写真

さらに、ヒストンメゾクラスターであるかを、暗視野顕微鏡下でのブラウン運動から拡散係数を算出し、粒径を見積もり、サイズによる確認を行った。その詳細の過程を以下に示す。

- (1) 2mg/l のヒストン溶液の暗視野顕微鏡観察における動画より、ヒストンメゾクラスターの挙動が分かる。この挙動を、0.03 秒ごとに X 座標と Y 座標をとり、152 プロットした。
- (2) プロットした座標 (X、Y) の時間 t における分散 σ^2 を求める。

$$\sigma^2 = (X_t - X_0)^2 \quad (4.1)$$

$$\sigma^2 = (Y_t - Y_0)^2 \quad (4.2)$$

(3) 時間 t に対する分散 σ^2 の関数をつくる(図 4.7)。このグラフの傾きが、下式より拡散係数 D の 4 倍の値($4D$)となる。なお、下式の係数は、一次元は 2、二次元は 4、三次元は 6 である。

$$\sigma^2 = 4Dt \quad (4.3)$$

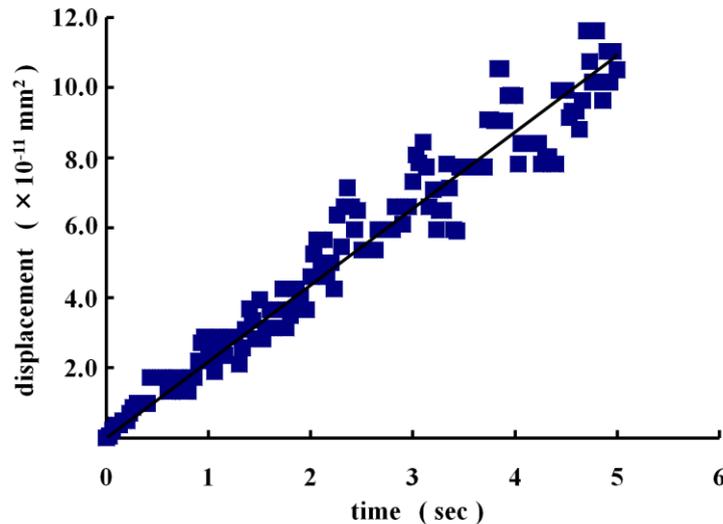


図 4.7 ヒストンクラスターの時間 t に対する分散 σ^2 のグラフ

(4) 4 で割ることで拡散係数 D が求まる。ヒストンクラスターの拡散係数 D は、 $5.0 \times 10^{-6} \text{m}^2/\text{sec}$ であり、この拡散係数を Stokes-Einstein 式(2.5)に代入し、流体力学的半径 a を求める。

ちなみに、 $RT=8.314472 \text{m}^2\text{kg}/\text{sec}^2\text{mol}$ ($T=293\text{K}$)、 $N_A=6.0221415 \times 10^{23} \text{mol}^{-1}$ 、 $\eta=0.0009109 \text{kg}/\text{msec}$ を示す。

よって、ヒストンメゾクラスターの半径は、 42.9nm と見積もることができる。(直径は、 85.8nm)

このことから、暗視野顕微鏡下で観察できたものは、 10nm 程度のヒストンオクタマーでも、数 μm の凝集物でもないヒストンメゾクラスターであることが分かる。さらに、動的光散乱法により測定したサイズの値をほぼ一致しているため、ヒストンメゾクラスターが、サイズ分散していると示唆できる。

4.5 FE-SEM によるヒストン溶液の観察

$1.2 \mu\text{m}$ フィルターをかけた $0.4 \text{g}/\text{l}$ のヒストン溶液(Sample 2)を自然乾燥させて、金蒸着を行った後、FE-SEM で観察した。図 4.8 から、ヒストンメゾクラスターが、均等に分散していると考えられる。

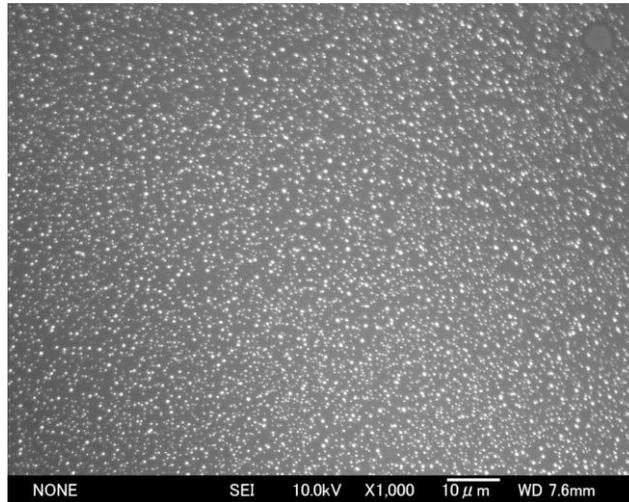


図 4.8 ヒストンクラスターの FE-SEM 写真

そして、倍率を上げていくと、ヒストンメゾクラスターとヒストンオクタマーが共存していることがわかる (図 4.9)。



図 4.9 ヒストンクラスターとヒストンオクタマーの FE-SEM 写真

また、ヒストンメゾクラスターが、ヒストンオクタマーの上に存在している。これは、異なる粒子が存在するときに、大きな粒子が浮上して、小さい粒子の上に積もるブラジルナッツ効果によるものと考察する (図 4.10)。

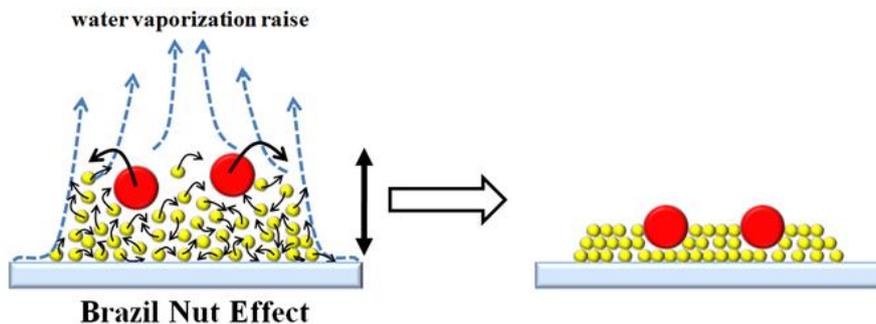


図 4.10 ブラジルナッツ効果

さらに、倍率を上げると、10nm 程度のヒストンオクタマーを確認できた (図 4.11)。このことから、FE-SEM による観察から、ヒストンメゾクラスターは、100nm 程度と確認でき、これは、動的
光散乱、暗視野顕微鏡下での画像解析のサイズ算出から示唆される。

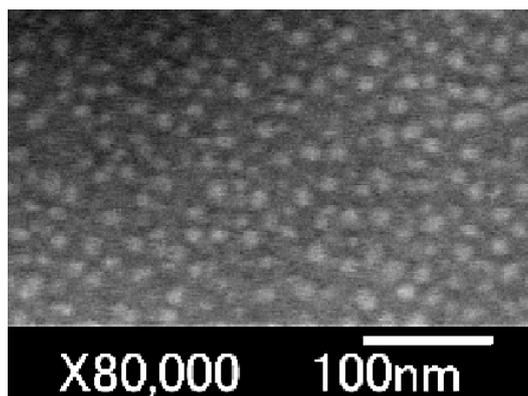


図 4.11 ヒストンオクタマーの FE-SEM 写真

4.6 ヒストンメゾクラスターの電荷特性評価

まず、ヒストンクラスターの泳動速度を電気泳動装置で計測し、ヒストグラムを作成した。

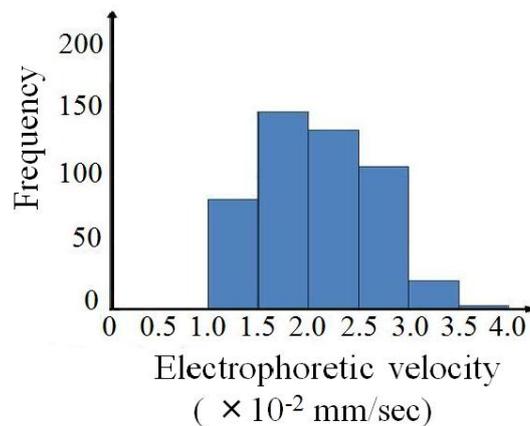


図 4.12 ヒストンクラスターの泳動速度ヒストグラム

図 4.12 は、縦軸を頻度、横軸を泳動速度($\times 10^{-2}$ mm/sec)とし、正の値をカチオン性、負の値をアニオン性とする。ヒストグラムは、2mg/l のヒストン溶液を、電場 5.55V/cm で、測定するガラスセルの中央部で、300 個計測した。この結果から、ヒストンメゾクラスターは、カチオン性を示しており、単分散したヒストグラムであるといえ、サイズ分散だけでなく、電荷的安定し分散していると考察できる。

次に、電場を変化させ、ヒストンメゾクラスターの電場依存性を調べた。

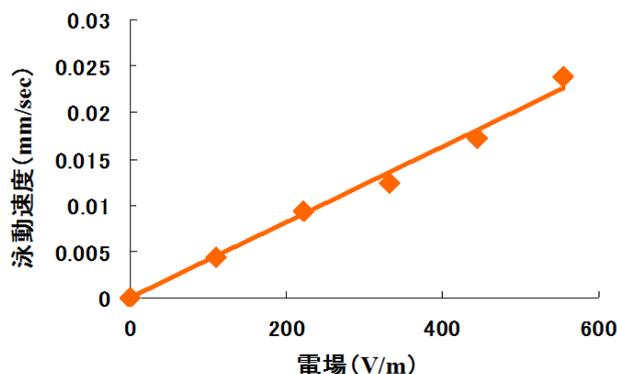


図 4.13 ヒストンメゾクラスターの移動度

図 4.13 は、縦軸を泳動速度(mm/sec)、横軸を電場(V/m)とし、正の傾きは、カチオン性、負の傾きはアニオン性と示す。2mg/l のヒストン溶液におけるヒストンクラスターを、ガラスセルの位置を変え、真の泳動速度を求めた。さらに、電場 111(V/m)、222(V/m)、333(V/m)、444(V/m)、556(V/m)と変化させ、真の泳動速度の電場依存性を検証する。このグラフから、電場に対して、泳動速度が比例関係にあるので、電場依存性があると分かる。また、この傾きは、移動度を示し、 4.0×10^{-4} ($\text{cm}^2 \text{S}^{-1} \text{V}^{-1}$)と求めることができる。この値は、第 7 章でヒストンの実効電荷量を定量化する時に利用する。

4.7 遠心分離によるヒストンのクラスター形成

図 4.3 の Sample 1 では、ヒストン粉末を純水に溶かして試料としているため、ヒストンメゾクラスター形成が平衡状態で生じるのか、ヒストン粉末が溶けきれず、粉末の塊のまま存在し、それを観察しているのかを調べる必要がある。そこで、以下の実験を行い、平衡状態におけるヒストンメゾクラスター形成に成功した。

ヒストンオクタマーだけの溶液を作成する方法を述べる。ヒストンオクタマーだけの状態にするために、フィルターによる分離と遠心分離による分離の 2 つの方法を試した。1 つ目は、ヒストンオクタマーは、10nm 程度なので、100nm フィルターを利用し、ヒストンメゾクラスターや凝集物の除去を試みたが、ヒストンの表面電荷が変化し、電荷を失ったり、大きな凝集物を形成したりと成功しなかった。2 つ目は、40mg/l のヒストン溶液を、遠心分離器による遠心分離を使って、ヒストンオクタマーの上澄み液を抽出し、Sample 4 を作成した。その条件は、653G で、6 時間の遠心分離を行った。その結果、図 4.14 が示すように、暗視野顕微鏡観察において、遠心分離処理直後の画像では、真っ暗になった。これは、背景を最大限に暗くしているため、10nm 程度のヒストンオクタマーは感知できない。よって、遠心分離によって、凝集物や、ヒストンメゾクラスターが存在しないヒストンオクタマーだけの状態を作り出すことに成功したといえる。

ヒストンオクタマーからヒストンクラスターが形成されるかを調べるため、遠心分離で抽出した上澄み液 10ml を、時間経過ごとに暗視野顕微鏡で観察した。まず、遠心分離直後は、先ほど述べたようにヒストンオクタマーのみが存在するため、真っ暗である。

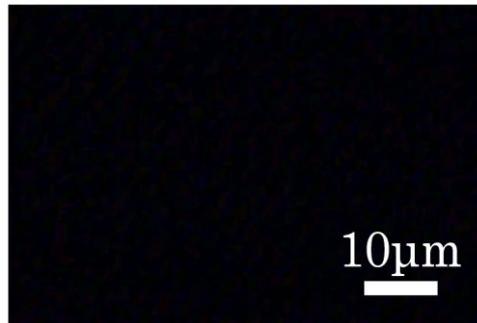


図 4.14 遠心分離処理直後の暗視野顕微鏡観察図

そして、24 時間経過までに、白く光るものが観察できたので、ヒストンメゾクラスターが、形成された可能性がある(図 4.15)(図 4.16)。その後、ほぼ 24 時間以降、その個数は一定となり、これをプロットした。

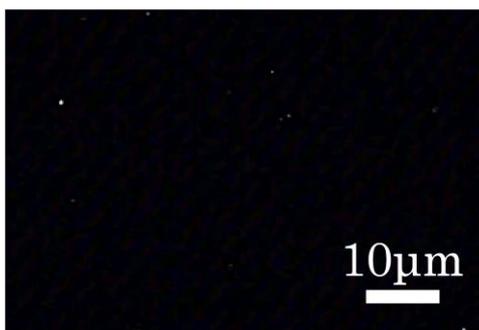


図 4.15 遠心分離処理 24 時間後の暗視野顕微鏡観察図

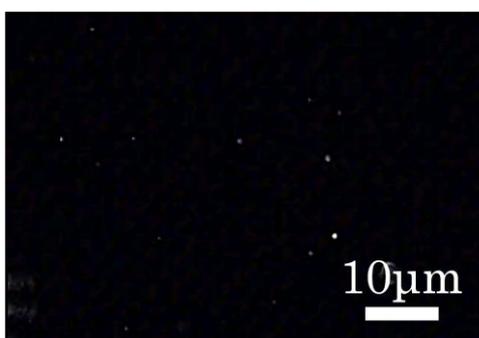


図 4.16 遠心分離処理 48 時間後の暗視野顕微鏡観察図

また、その抽出液を利用して、ヒストンメゾクラスター形成時のヒストン溶液の濃度変化を、ブラッドフォード法で染色して、595nm の吸光度を分光光度計で計測した。

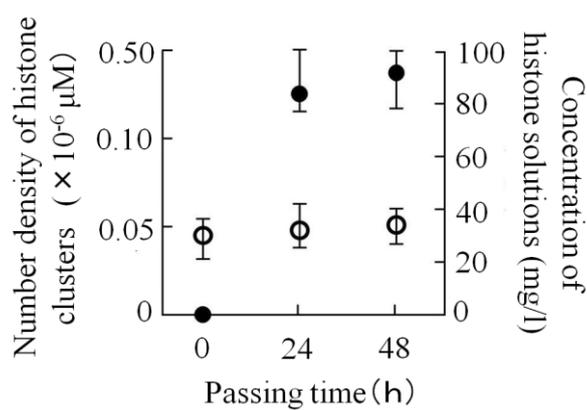


図 4.17 ヒストンクラスターの数密度とヒストン溶液の濃度変化

図 4.17 は、縦軸左に、ヒストンクラスターの数密度($\times 10^{-6} \mu\text{M}$)、縦軸右に、ヒストン溶液の濃度(mg/l)、横軸に、経過時間(h)を示している。その結果、ヒストン濃度が変化することなく、ヒストンのクラスター形成が行われたことが分かる。よって、ヒストン溶液は、ヒストンオクタマーが、ヒストン

クラスターを形成し、平衡状態を保っていると考えられる。

遠心分離処理で、ヒストンオクタマーから形成されたヒストンメゾクラスターが、ヒストン粉末を純粋で溶かして生じたヒストンメゾクラスターと同じ物であることを検証するために、暗視野顕微鏡観察による画像解析を利用し、拡散係数を求めた。

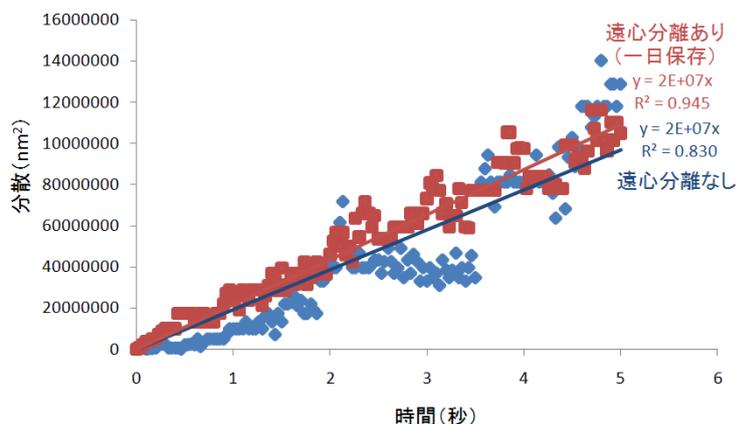


図 4.18 遠心分離後に形成したヒストンクラスターの拡散係数

図 4.18 は、縦軸に分散(nm^2)、横軸に時間(秒)をとり、青色は、図 4.7 の遠心分離なしでのヒストンクラスターの拡散係数、赤色は、遠心分離後 1 日保存したヒストンクラスターの拡散係数を示す。このグラフから、遠心分離に関係なくヒストンクラスターのサイズはほぼ一致しているといえる。

次に、電気泳動測定器による移動度の測定し、遠心分離の前後によるヒストンクラスターの電荷的特性を調べた。

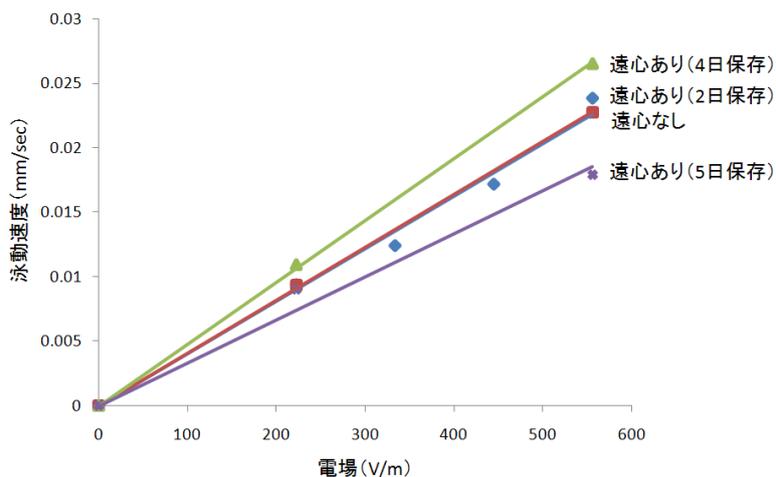


図 4.19 遠心分離後に形成したヒストンクラスターの移動度

図 4.19 が、縦軸に泳動速度(mm/sec)、横軸に電場(V/m)を示す。赤色は、遠心分離前のヒストン溶液で $4.6 \times 10^{-4}(\text{cm}^2\text{S}^{-1}\text{V}^{-1})$ 、青色は、遠心分離後 2 日保存したヒストン溶液で $4.5 \times 10^{-4}(\text{cm}^2\text{S}^{-1}\text{V}^{-1})$ 、黄緑色は、遠心分離後 4 日保存したヒストン溶液で $5.3 \times 10^{-4}(\text{cm}^2\text{S}^{-1}\text{V}^{-1})$ 、紫色は、遠心分離後 5 日保存したヒストン溶液で $3.7 \times 10^{-4}(\text{cm}^2\text{S}^{-1}\text{V}^{-1})$ の傾きを表している。このグラフから、遠心分離後も、移動度をほぼ同じ値を示すので、ヒストンクラスターの電荷特性は変化していないと考える。

よって、遠心分離後に形成されたヒストンクラスターは、遠心分離前のヒストンクラスターと比較したとき、サイズかつ電荷特性ともに再現性があるといえる。

4.8 溶媒変化によるヒストンクラスター形成

溶媒変化として、緩衝液と pH の変化、塩添加におけるクラスターの変化について、フィルター孔径依存性を利用して研究した。

4.8.1 ポリスチレン粒子のフィルター依存性

フィルター孔径の違いにおける暗視野顕微鏡での観察のサンプルとして、300nm のポリスチレン粒子で測定した。

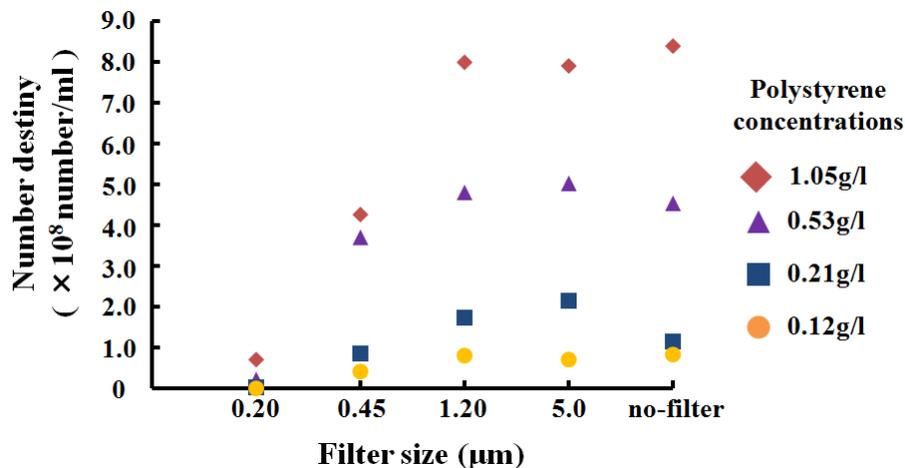


図 4.20 フィルター孔径によるポリスチレンの数密度変化

図 4.20 は、縦軸に数密度($\times 10^8$ 個/ml)、横軸にフィルター孔径(μm)とする。このグラフから、 $0.45\mu\text{m}$ 孔径のフィルターで数密度が減少し、 $0.2\mu\text{m}$ 孔径フィルターで、ほぼ消失していることが分かり、約 300nm のポリスチレン粒子におけるフィルター孔径依存性がいえる。

4.8.2 濃度変化に対するヒストンクラスターのフィルター依存性

濃度を変化させて、ヒストンメゾクラスターについて、ポリスチレン同様の測定を行い、フィル

ター依存性を調べた。

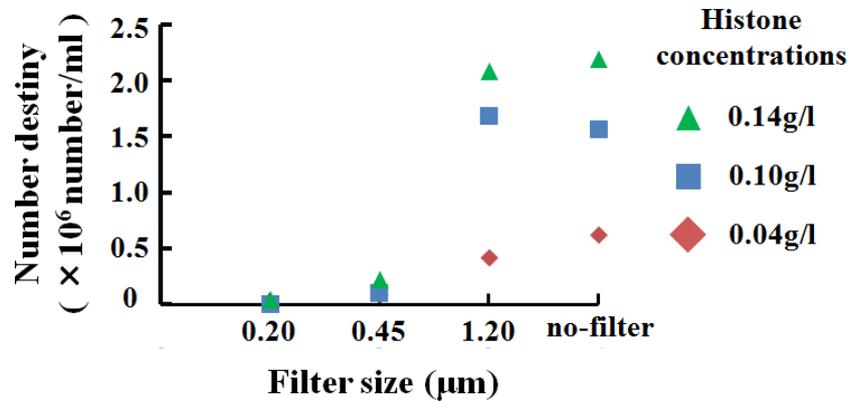


図 4.21 フィルター孔径によるヒストンクラスターの数密度変化

図 4.21 は、縦軸に数密度($\times 10^6$ 個/ml)、横軸にフィルター孔径(μm)とする。ヒストン濃度は、緑色で 0.14g/l、青色は、0.10g/l、赤色は、0.04g/l である。このグラフより、ヒストンメゾクラスターが消失している。この理由として、フィルターを通すときに、ヒストンオクタマーとの共存により、フィルターが詰まり、このような結果になったと考察する。

4.8.3 トリス塩酸溶液の添加によるヒストンクラスターのフィルター依存性

緩衝液として、1M のトリス塩酸溶液を添加して、同様の実験を行った。本研究において、50ml の純水に対し、1M のトリス塩酸溶液 500 μl を加えると緩衝効果を示した。図 4.22 は、ヒストン 0.04g/l のヒストン溶液におけるトリス塩酸の添加量によるヒストンクラスターの数密度変化を示している。また、pH8 と pH7.5 の二種類のトリス塩酸溶液でも比較を行う。

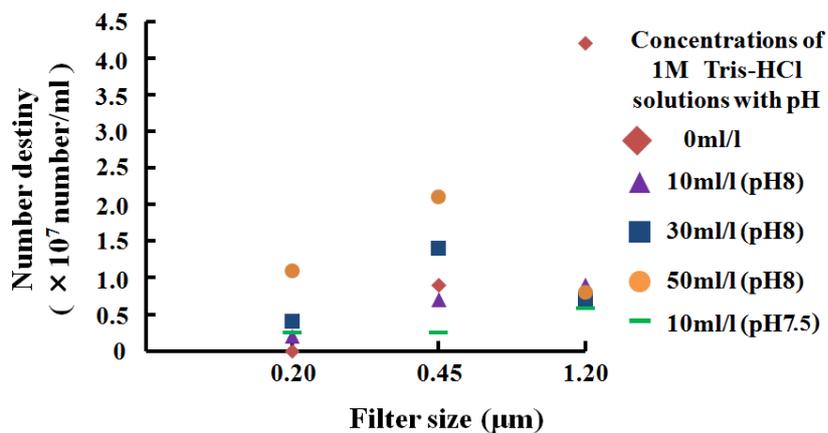


図 4.22 フィルター孔径によるトリス溶液添加ヒストンクラスターの数密度変化

図 4.22 は、縦軸に数密度($\times 10^6$ 個/ml)、横軸にフィルター孔径(μm)とする。ヒストン濃度は、1M のトリス塩酸溶液の添加する濃度順に、赤色は添加なし、紫色は、pH8 のトリス塩酸溶液を 10ml/l、青色は、pH8 のトリス塩酸溶液を 30ml/l、黄色は、pH8 のトリス塩酸溶液を 50ml/l、緑色は、pH7.5 のトリス塩酸溶液を 10ml/l 添加している。このグラフから、純水のみにおけるヒストンクラスターの数密度に対し、トリス溶液の濃度変化や、トリス塩酸溶液の pH に関わらず、トリス塩酸を添加したヒストン溶液のクラスターは、数密度が少なく、フィルター依存性も低い。そして、10ml/l のトリス塩酸添加した 0.4g/l のヒストン溶液の FE-SEM で観察した (図 4.23)。



図 4.23 トリス溶液におけるヒストンクラスターの FE-SEM 図

図 4.23 が示すように、図 4.8 と比較すると、ヒストンクラスターの数密度が少ないことが分かる。よって、トリス塩酸を添加することで、ヒストンメゾクラスターが減少したので、クラスターのよ様な中間体がなくなり、ヒストンオクタマーと凝集物の二分化が促進されたと考えられる。

さらに、暗視野顕微鏡下での画像解析により、平均拡散係数を求めた。

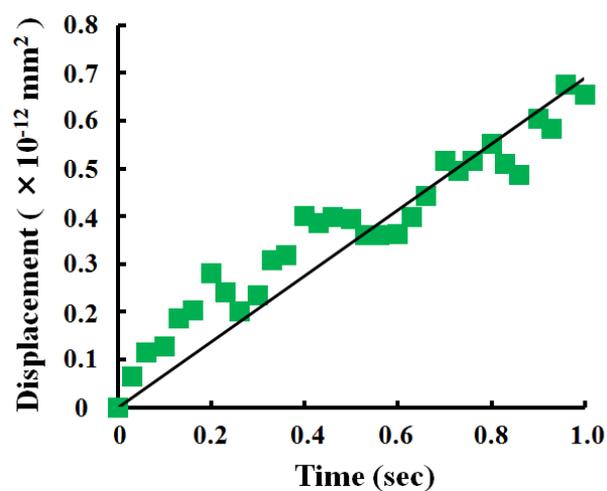


図 4.24 トリス溶液添加ヒストンクラスターの拡散係数グラフ

図4.24は、10ml/lのトリス塩酸添加した0.04g/lのヒストン溶液を利用し、縦軸に、分散($\times 10^{-12} \text{mm}^2$)、横軸に、時間(秒)とした。また、傾きが拡散係数の4倍を示している。このグラフから、 $1.75 \times 10^{-12} \text{m}^2/\text{sec}$ と求めた。そして、ストークス・アインシュタイン式(式2.5)に代入すると、トリス添加によるヒストンクラスターは、直径122.6nmと見積もることができる。

また、タンパク質の電気泳動として、緩衝液とSDSを利用する。その例として、SDS添加によるポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)がある。それは、電圧をかけて、アクリルアミドを重合させたゲル上に荷電粒子を移動して、粒径の違う粒子を分離できる方法である。しかし、タンパク質は、アミノ酸配列の影響で、立体構造が違うので、同じ分子量でも移動速度に差異が生じる。そのため、タンパク質に、界面活性剤であるSDSを加えて、タンパク質を直鎖状に変形させ、電気泳動を測定している(図4.25)。

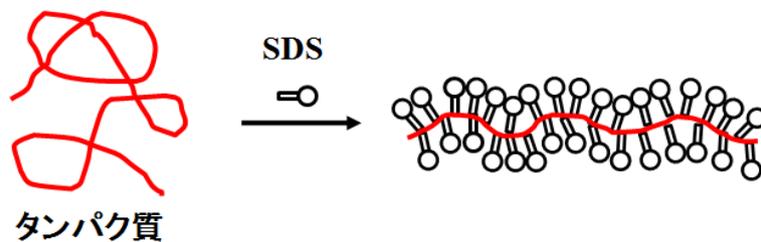


図 4.25 SDS 添加によるタンパク質の変性

そこで、本研究では、SDSとタンパク質であるヒストンの関係性を暗視野顕微鏡で観察し、フィルター依存性を調べた。その詳細の方法は、トリス塩酸10ml/lにおける0.04g/lヒストン溶液を作成し、SDS濃度を変化させて、暗視野顕微鏡で観察した。その結果を、図4.26で示す。

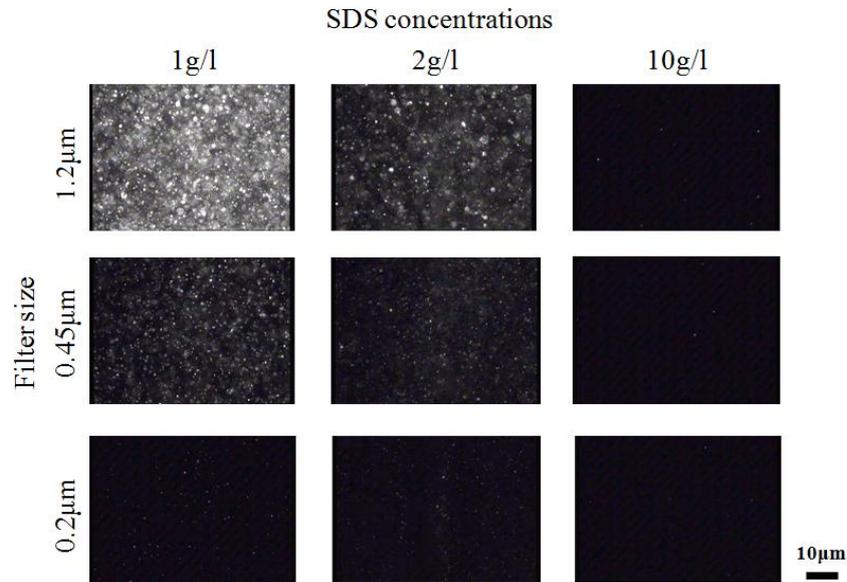


図 4.26 SDS 添加によるトリス溶液のヒストンクラスター暗視野顕微鏡図

図 4.26 は、縦軸にフィルター孔径の変化、横軸に SDS 濃度の変化を示し、上から順に 1.2 μm フィルター、0.45 μm フィルター、0.2 μm フィルターをかけている。また、左から右側へは、SDS 濃度 1g/l、2g/l、10g/l を示している。まず、SDS が、1g/l で、ヒストンクラスターが、純水やトリス塩酸添加による溶液よりはるかに急増し、沈殿も生じた。次に、SDS を 2g/l の場合、1g/l のヒストンクラスターの個数より減少したが、沈殿が生じる。10g/l の SDS を添加した場合、ヒストンクラスターは、前の濃度よりはるかに減少し、沈殿が生じなかった。このことから、SDS を添加することで、クラスターの数が変化したので、以下の 2 つを考察した。1 つ目は、SDS が、ある濃度を超えない限り、ヒストン溶液に存在するヒストンオクタマーを囲い込んで、ヒストンクラスターが形成され、純水中より、はるかに増大したと推測できる。また、この現象は、ヒストン溶液において、ヒストンクラスターと多数のヒストンオクタマーが、共存していることを示唆している。2 つ目は、ある濃度を超えると、SDS が、ヒストンクラスター内に侵入し、クラスターが崩壊し、凝集靴やヒストンクラスターが、ヒストンオクタマーに分離したか、ヒストンオクタマーが変形し、直鎖状になったことから、ヒストンクラスターの個数が減少したと考える。

さらに、フィルター孔径の依存性を調べるため、純水のみ、10ml/l トリス塩酸を添加した溶液と、数密度が計測できる 10g/l の SDS を添加した 10ml/l トリス塩酸を含む溶液のヒストンクラスターの数密度を比較した。

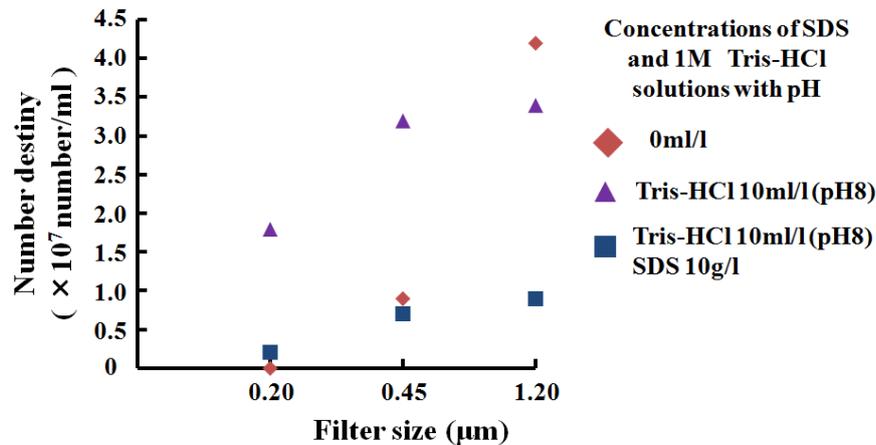


図 4.27 フィルター孔径による SDS 添加トリス溶液におけるヒストンクラスターの数密度変化

図 4.27 は、縦軸に数密度($\times 10^7$ 個/ml)、横軸にフィルター孔径(μm)とする。赤色は、純水のみ、紫色は、pH8 のトリス塩酸溶液を 10ml/l を添加したヒストン溶液、青色は、トリス塩酸溶液を 10ml/l に、SDS10g/l を添加したヒストン溶液である。その結果、0.2 μm 孔径のフィルターを通した時、他の 2 つの試料に比べ、SDS を含むヒストン溶液のヒストンクラスターの数密度が少ない。このことから、ヒストンクラスター内に SDS が侵入したため、ヒストンのクラスターの粒径が小さくなった。または、SDS が侵入し、ヒストンクラスター内の結合が弱くなり、フィルターを通過した時に、ヒストンクラスターが分裂し、暗視野顕微鏡での観察が不可能となったと考察する。

4.8.4 リン酸溶液または酢酸溶液におけるヒストンクラスターのフィルター依存性

まず、トリス塩酸以外の緩衝液として、リン酸の緩衝液と酢酸の緩衝液で、同様な実験方法で、フィルター依存性を調べた。

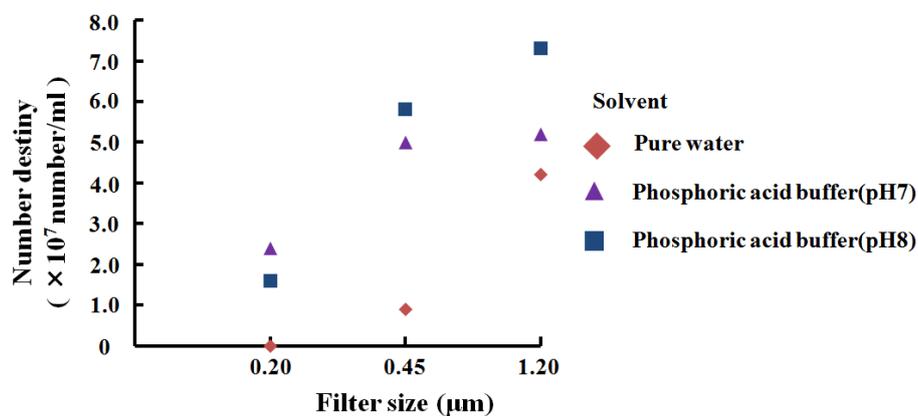


図 4.28 フィルター孔径によるリン酸溶液におけるヒストンクラスターの数密度変化

図 4.28 は、縦軸に数密度($\times 10^7$ 個/ml)、横軸にフィルター孔径(μm)とする。赤色は、純水のみ、紫色は、pH7 に調整したリン酸溶液、青色は、pH8 に調整したリン酸溶液にヒストン粉末を溶かしている。このグラフから、pH7 で調整したリン酸バッファーでは、溶媒が純水のものに比べ、ヒストンクラスターの数密度が多く、pH8 で調整したリン酸バッファーでは、純水とあまり変わらない。また、 $0.45\mu\text{m}$ 孔径フィルターと $0.2\mu\text{m}$ 孔径のフィルターを通した時、2 種のリン酸バッファーのヒストン溶液が、純水だけのヒストン溶液より数密度が大きいため、純水の時より、サイズの小さいクラスターが形成されたと考察する。そして、pH8 という観点から比較すると、リン酸溶液で調整したヒストン溶液は、トリス塩酸で調整したヒストン溶液に比べて、ヒストンクラスターが増加している。

次に、pH 4.5 に調整した酢酸バッファーを利用した場合の実験結果を以下に示す。

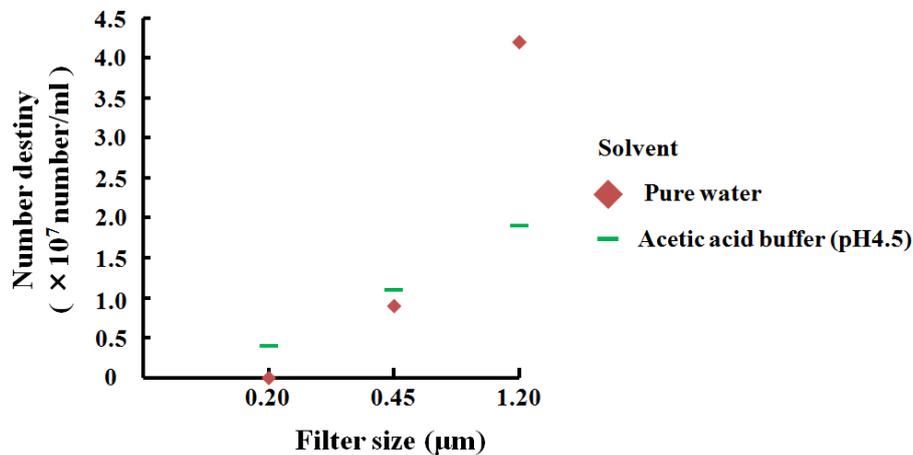


図 4.29 フィルター孔径による酢酸溶液におけるヒストンクラスターの数密度変化

図 4.29 は、縦軸に数密度($\times 10^7$ 個/ml)、横軸にフィルター孔径(μm)とする。赤色は、純水のみ、緑色は、pH4.5 に調整した酢酸溶液にヒストン粉末を溶かしている。このグラフの結果から、純水だけのヒストン溶液に比べ、ヒストンクラスターの数密度が小さい。その後、フィルターに対する変化は、純水だけの場合と似ている。また、図 4.30 で示す酢酸溶液におけるヒストンクラスターの FE-SEM 図は、図 4.8 の純水のみにおけるヒストンクラスターの FE-SEM 図と類似している。

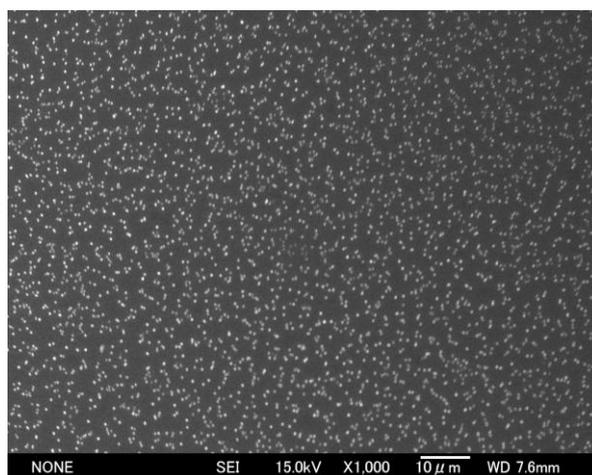


図 4.30 酢酸溶液におけるヒストンクラスターの FE-SEM 図

4.8.5 ヒストンクラスターの pH 依存性

pH 依存性によるヒストンクラスターの形状変化を暗視野顕微鏡で観察した。

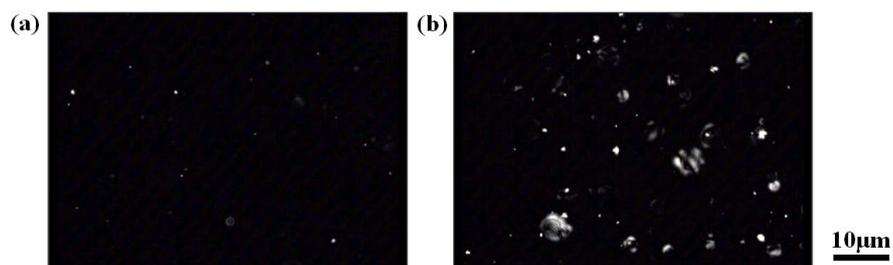


図 4.31 pH 依存性によるヒストン溶液の暗視野顕微鏡図 (a) pH3 (b) pH11

図 4.31(a)は、塩酸を利用して、pH3 に調整し、1 日保存したヒストン溶液を、暗視野顕微鏡で観察した。純水と同様、ヒストンクラスターが存在していると考えられる。図 4.31(b)は、水酸化ナトリウムを利用して、pH11 に調整し、1 日保存したヒストン溶液の観察では、ヒストンは凝集している。また、pH2 で調整後 1 日保存した場合、タンパク質の構造が破壊され、クリーミングが生じている。そして、pH12 で調整後 1 日保存した場合、タンパク質は凝集し、沈殿し、pH11 で調整したヒストン溶液は、数日後に沈殿した。

4.8.6 塩添加によるヒストンクラスターのフィルター依存性

純水のみで作成したヒストン溶液に対し、塩化ナトリウムを添加して、暗視野顕微鏡で観察した。

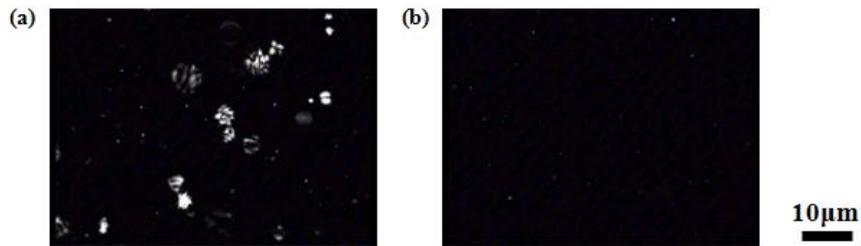


図 4.32 塩化ナトリウム添加によるヒストン溶液の暗視野顕微鏡図
(a) 0.1 μ M 塩添加ヒストン (b) 0.1 μ M 塩添加ヒストン(1.2 μ m フィルター)

図 4.32(a)が示すように、引力が増加し、凝集物が多くみられる。また、図 4.32(b)は、1.2 μ m 孔径のフィルターに通すと、ヒストンクラスターのような形状の物体が存在している。そこで、ヒストンクラスターであるかを確認するため、電気泳動測定装置を利用して、移動度を測定した。

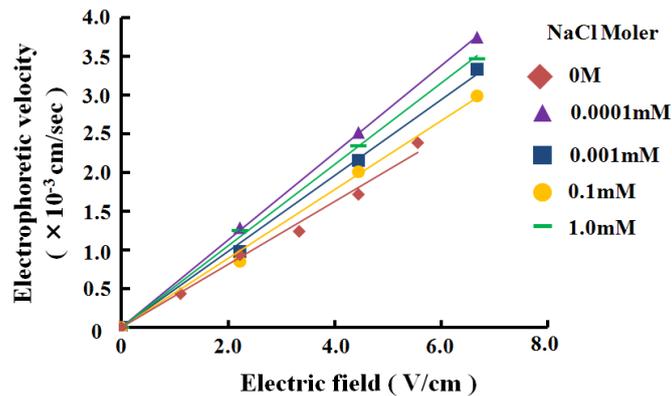


図 4.33 塩化ナトリウム添加によるヒストンクラスターの移動度

図 4.33 は、縦軸を、泳動速度($\times 10^{-3}$ cm/sec)、横軸を電場(V/cm)とし、傾きが正の時、カチオン性、負の時、アニオン性を示す。暗視野顕微鏡の観察におけるガラスセルの位置を変え、第 2 章で説明した真の泳動速度を測定した。また、NaCl 添加なしのヒストンクラスターは、図 4.17 の移動度を利用し、その他の試料は、電場 2.22(V/cm)、4.44(V/cm)、6.67(V/cm)の 3 点で測定した。グラフの表示は、NaCl 添加した濃度で、赤色は、添加なし、紫色は、0.0001mM、青色は、0.001mM、黄色は、0.1mM、緑色は、1.0mM を示す。傾きは、添加する NaCl 濃度が少ない順に、 $4.0 \times 10^{-4}(\text{cm}^2\text{S}^{-1}\text{V}^{-1})$ 、 $5.6 \times 10^{-4}(\text{cm}^2\text{S}^{-1}\text{V}^{-1})$ 、 $4.9 \times 10^{-5}(\text{cm}^2\text{S}^{-1}\text{V}^{-1})$ 、 $4.4 \times 10^{-4}(\text{cm}^2\text{S}^{-1}\text{V}^{-1})$ 、 $5.3 \times 10^{-4}(\text{cm}^2\text{S}^{-1}\text{V}^{-1})$ となる。このグラフから、NaCl を添加したヒストンクラスターは、電場に対して比例関係を示すので、電場依存性があることが分かる。そして、純水におけるヒストンクラスターより、移動度が少し大きい。これは、塩添加による溶媒変化が原因だと考えられ、塩添加後、1.2 μ m フィルターを通した得た物体は、ヒストンクラスターであると推察する。

第5章 カチオン性高分子添加によるシリカ粒子の電荷符号反転

本研究では、正電荷のPAHを添加して、負電荷のシリカ粒子の電荷反転特性を移動度のグラフで表し、電荷反転特性における電荷的中和状態でのPAH濃度を利用して、シリカ粒子の表面電荷を見積もった。

5.1 PAH添加によるシリカ粒子の電荷符号反転

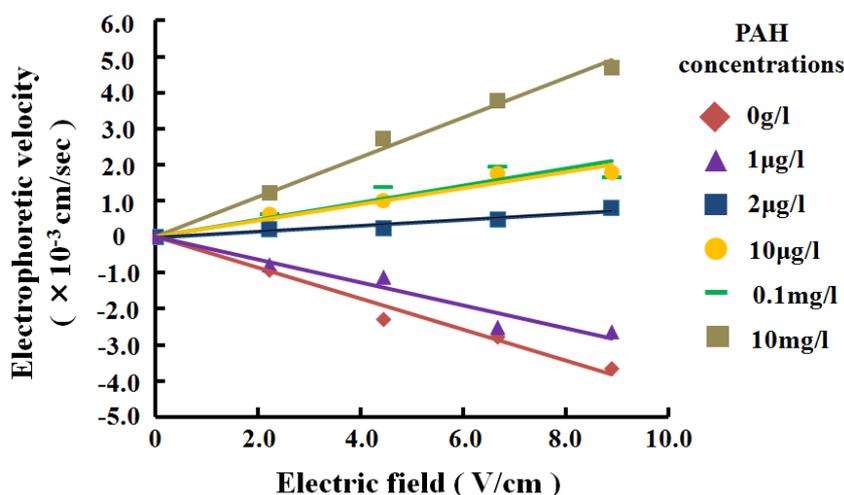


図 5.1 PAH 添加によるシリカ粒子の電荷符号反転グラフ

図5.1は、PAH添加によるシリカ粒子の泳動速度の電場依存性を示すグラフである。縦軸を泳動速度($\times 10^{-3}$ cm/sec)、横軸を電場(V/cm)とし、傾きが正の時、カチオン性、負の時、アニオン性を示す。暗視野顕微鏡の観察におけるガラスセルの位置を変え、第2章で説明した真の泳動速度を測定し、電場2.22(V/cm)、4.44(V/cm)、6.67(V/cm)、8.89(V/cm)の4点で測定した。グラフの表示は、シリカ粒子に添加したPAH(分子量56000)の濃度で、赤色は、添加なし、紫色は、1 μ g/l、青色は、2 μ g/l、黄色は、10 μ g/l、緑色は、0.1mg/l、灰色は、10mg/lを示す。各々の傾きは、電場の変化に対して比例関係を示すので、電場依存性があると分かり、その傾きが、移動度と考えることができる。この移動度は、添加するPAH濃度が小さい順に、 $-4.3 \times 10^{-4}(\text{cm}^2\text{S}^{-1}\text{V}^{-1})$ 、 $-3.2 \times 10^{-4}(\text{cm}^2\text{S}^{-1}\text{V}^{-1})$ 、 $8.0 \times 10^{-5}(\text{cm}^2\text{S}^{-1}\text{V}^{-1})$ 、 $2.3 \times 10^{-4}(\text{cm}^2\text{S}^{-1}\text{V}^{-1})$ 、 $2.4 \times 10^{-4}(\text{cm}^2\text{S}^{-1}\text{V}^{-1})$ 、 $5.5 \times 10^{-4}(\text{cm}^2\text{S}^{-1}\text{V}^{-1})$ となる。このグラフから、カチオン性であるPAHを添加することで、アニオンであるシリカ粒子の電荷符号反転が生じているといえる。また、

移動度のゼロに近い、すなわち傾きがない場合を、電荷中和状態であると考えることが出来る。図 5.1では、PAH添加によるシリカ粒子の電荷の中和状態でのPAH濃度は、1 μ g/lから2 μ g/lの間であると推測できる。この値を利用して、シリカ粒子の電荷的特性の評価を次項で行う。

5.2 PAH 添加によるシリカ粒子の電荷符号反転から見積もる電荷量

電荷モル濃度の見積もり方を示す。反転に必要な PAH 濃度は、1 μ g/l から 2 μ g/l の間より、鎖長の長い PAH 分子量 56000g/mol と、+1 価の電荷を帯びているアリルアミン分子量 57g/mol を利用すると、電荷モル濃度は、

$$\frac{1 \times 10^{-6}}{56000} \times \frac{56000}{57} = 17.5 \text{ nM} \quad (5.1)$$

$$\frac{2 \times 10^{-6}}{56000} \times \frac{56000}{57} = 35.1 \text{ nM} \quad (5.2)$$

と求めることができる。

次に、シリカ粒子表面の電荷量を、電荷中和状態における PAH のモル濃度から見積もる。シリカ粒子の 1 個あたりの表面電荷量は、電荷中和状態に必要なとされた PAH の全電荷量個数と 1L における溶液に含まれるシリカ粒子の総個数の商で計算できる。本研究で使用したシリカ粒子を含んだ溶液の数密度である 9.6 $\times 10^5$ 個/ml を使う。最小値は、電荷モル濃度 17.5nM を代入して、

$$\frac{17.5 \times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23}}{9.6 \times 10^5 \times 1000 \text{ ml}} = \frac{17.5 \times 6.02}{9.6} \times 10^6 = 1.1 \times 10^7 \quad (5.3)$$

最大値は、電荷モル濃度 35.1nM を代入して、

$$\frac{35.1 \times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23}}{9.6 \times 10^5 \times 1000 \text{ ml}} = \frac{35.1 \times 6.02}{9.6} \times 10^6 = 2.2 \times 10^7 \quad (5.4)$$

となり、シリカ粒子の裸の電荷量は、 $-1.1 \times 10^7 \sim -2.2 \times 10^7$ と見積もることができる。この値を 1nm² あたりのシリカ粒子の電荷量で示すと、最小値は、裸の電荷量 -1.1×10^7 を代入して、

$$\frac{1.1 \times 10^7}{4\pi r^2} = \frac{1.1 \times 10^7}{4 \times 3.14 \times (5 \times 10^2)^2} = \frac{11}{3.14} = 3.5 \quad (5.5)$$

最大値は、裸の電荷量 -2.2×10^7 を代入して、

$$\frac{1.1 \times 10^7}{4\pi r^2} = \frac{2.2 \times 10^7}{4 \times 3.14 \times (5 \times 10^2)^2} = \frac{22}{3.14} = 7.0 \quad (5.6)$$

となり、シリカ粒子の表面 1nm^2 あたり -3.5 価から -7.0 価をもつことがわかる。そして、シリカ粒子の表面電荷について、妥当性がいえる論文の報告がある[27]。よって、電荷的中和状態における PAH 濃度から、シリカ粒子の裸の電荷量が見積もることができた。この結果から、PAH は、シリカ粒子の表面に、密に結合するため、図 1.15 のように結合していると考察する。

第6章 カチオン性高分子添加による マイクロバブルの電荷符号反転

6.1 本研究の目的

マイクロバブルの医療分野の応用研究として、超音波照射による薬物導入媒体や、遺伝子投入における遺伝子治療について説明する。前者の詳細は以下の通りである。標的器官または組織を、カチオン性リポソームにより、中性に荷電した脂質のマイクロバブル内に有効成分を導入する。この有効成分をカプセル化した脂質マイクロバブルが、標的器官または組織に達した時、超音波処理を行い、有効成分を選択的に放出する仕組みである（図 6.1） [28]。

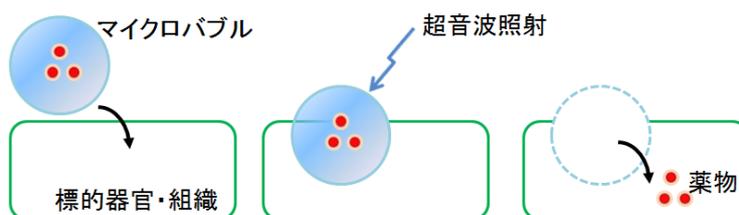


図 6.1 超音波照射による薬物導入媒体

後者は、マイクロバブルは、カチオン性脂質と DNA を交互に吸着させ、多層の膜を形成するマイクロバブルカプセルを作成する [28,29-31]。そして、このカプセルを、細胞内に導入して、細胞内に遺伝子を投入する [12,28]。この方法は、DNA 単体、または DNA・カチオン性高分子複合体による導入より、遺伝子導入率が高いという報告がある [13]。さらに、多層化マイクロバブルカプセルの作成プロセスを、ゼータ電位測定を利用して、電荷符号反転特性の研究が行われている（図 6.2） [32]。図 6.2 は、カチオン性脂質でコーティングしたマイクロバブルに、負電荷の DNA を添加すると、カプセル表面に結合し、ゼータ電位が負の値を示す。このカプセルに、正電荷のポリリジン(PLL) を添加すると、ゼータ電位が正の値を示す。このことから、それぞれのカウンターイオンを持つ高分子を添加することで、電荷符号反転が生じていることを表している。

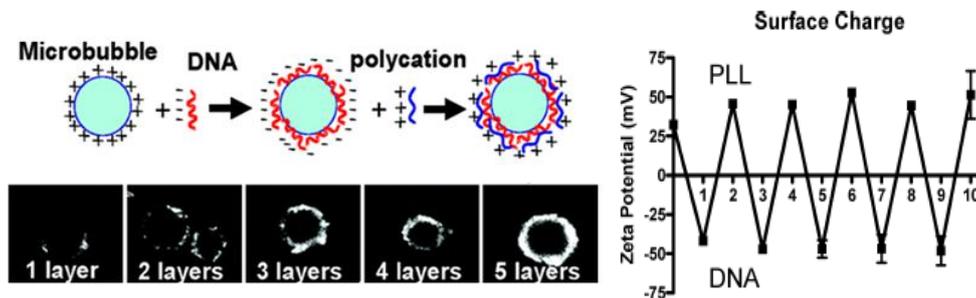


図 6.2 DNA 被膜マイクロバブル作成プロセス図 [32]

以上のように、マイクロバブルの医療への応用研究は進んでいる。また、マイクロバブルカプセルの形成は、カチオン化界面活性剤や、カチオン化脂質を使って、マイクロバブルの表面をコーティングすることが一般的となっている。このコーティングする過程が必要かを検証するため、本研究では、カチオン性の脂質やカチオン性界面活性剤を使わず、マイクロバブルにカチオン性高分子を吸着させ、その電荷特性について評価した。具体的には、まず、マイクロバブルの安定性、2 種類の鎖長が違うカチオン高分子である PAH を添加したマイクロバブルの電荷符号反転特性の比較、シリカ粒子との電荷符号反転特性の比較を行った。

6.2 マイクロバブルの安定性評価

6.2.1 マイクロバブルの粒径算出

マイクロバブルの粒径の安定性として、暗視野顕微鏡による画像解析により粒径算出を行った。以下に結果を示す。図 6.3 の傾きは、拡散係数の 4 倍の値を表し、マイクロバブルの拡散係数は、 $1.0 \times 10^{-10} \text{m}^2/\text{sec}$ と見積もることが出来た。そして、ストークス・アインシュタイン式(2.5)に、 $D=1.0 \times 10^{-10} \text{m}^2/\text{sec}$ 、 $RT=8.314472 \text{m}^2 \text{kg}/\text{sec}^2 \text{mol}$ ($T=293\text{K}$)、 $N_A=6.0221415 \times 10^{23} \text{mol}^{-1}$ 、 $\eta=0.0009109 \text{kg}/\text{msec}$ 代入し、半径を見積もると、マイクロバブルの平均半径は、214.4nm と算出できる。

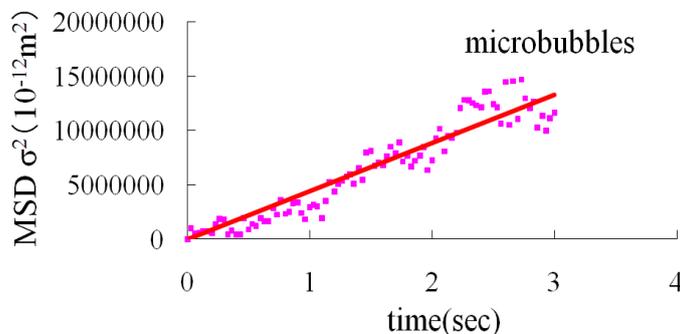


図6.3 マイクロバブルの拡散係数

6.2.2 マイクロバブルの時間依存性

実験時に、マイクロバブル及びPAH・マイクロバブル複合体の安定分散性が、保持できなければならぬ。そこで、マイクロバブル及びPAH・マイクロバブル複合体の安定分散性を確認する。

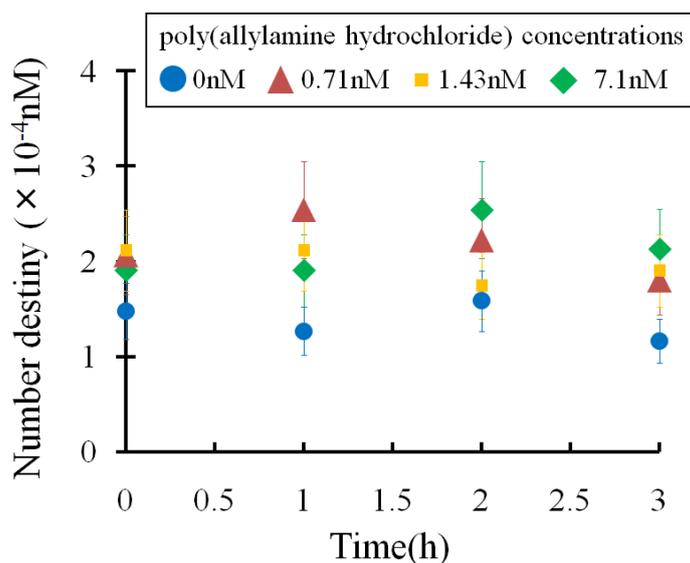


図6.4 マイクロバブル及びPAH添加したマイクロバブルの数密度の時間依存性

図6.4は、縦軸をマイクロバブルの及びPAHを添加したマイクロバブルの数密度($\times 10^{-4}\text{nM}$)、横軸を経過時間(h)と示す。グラフのプロットは、マイクロバブルに添加したPAH (分子量56000) の高分子モル濃度で、青色は、添加なし、赤色は、0.71nM、黄は、1.43nM、緑は、7.1nMである。各々の数密度は、PAH添加なしで、 $1.27 \times 10^{-4} \sim 1.59 \times 10^{-4}\text{nM}$ 、0.71nMのPAH添加で、 $1.80 \times 10^{-4} \sim 2.53 \times 10^{-4}\text{nM}$ 、1.43nMのPAH添加で、 $1.75 \times 10^{-4} \sim 3.12 \times 10^{-4}\text{nM}$ 、7.1nMのPAH添加で、 $1.90 \times 10^{-4} \sim 2.54 \times 10^{-4}\text{nM}$ を表している。

図6.4が示すように、3時間経過しても、各々の数密度は変化しなかった。このことから、マイクロバブル及びマイクロバブル・PAH複合体が、安定分散しているといえる。この安定分散する理由として、表面電荷の反発により結合しなかったと考察する。これは、結合する可能性が高い電気的中性の状態ではなく、表面に電位が生じていることを示唆している。

6.3 PAH添加によるマイクロバブルの電荷符号反転特性

マイクロバブルに、PAH添加濃度を変化させ、マイクロバブルの電荷符号反転特性を調べる。

まず、分子量56000であるPAHの濃度は、0.04mg/l \sim 0.4mg/lで測定を行う。暗視野顕微鏡のガラスセルの中央部で観察し、電場5.55 (V/cm)に設定して、マイクロバブル及びPAHを添加したマイクロ

バブルの泳動速度を計測し、ヒストグラムを作成した。

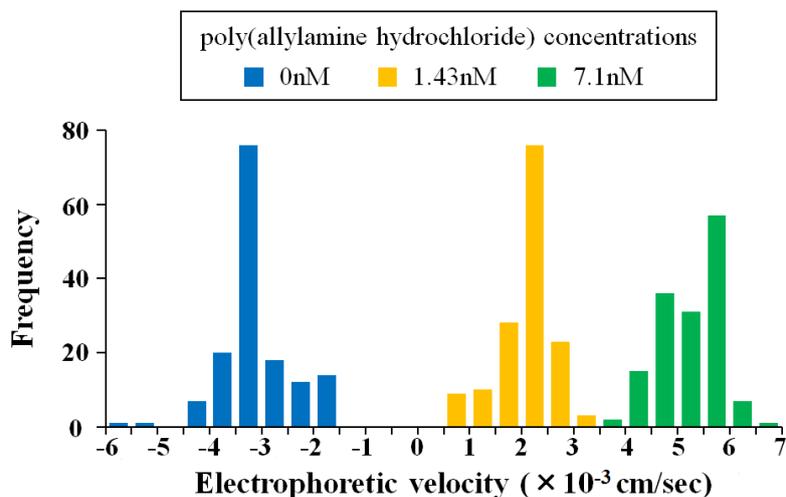


図6.5 マイクロバブル及びマイクロバブル・PAH複合体のヒストグラム

図 6.5 は、縦軸を頻度、横軸を泳動速度($\times 10^{-3}$ cm/sec)とし、正の値をカチオン性、負の値をアニオン性とする。各々のヒストグラムは、マイクロバブルに添加した PAH (分子量 56000) の高分子モル濃度で、青は、添加なし、黄は、1.43nM、緑は、7.1nM を示す。

まず、PAHを添加していないマイクロバブルは、泳動速度が負の値を示すヒストグラムとなり、本研究でもマイクロバブルが負電荷を帯びていることが分かる。次に、PAHのモル濃度1.43nMを添加した時、マイクロバブル・PAH複合体は、電荷反転していないが、泳動速度が低下している。これは、カチオンであるPAHが、マイクロバブルの負電荷を低下させている。そして、PAHのモル濃度7.1nM添加した場合、泳動速度は、正の値を示し、電荷符号反転が起こり、カチオン性になった。したがって、PAHの高分子モル濃度の変化で、マイクロバブルが、アニオン性からカチオン性に電荷符号反転しているといえる。また、各々のヒストグラムは、単分散しているといえ、マイクロバブル及びPAH添加によるマイクロバブルは、電荷的安定し、分散していると考察できる。

次に、PAHの高分子モル濃度を変え、マイクロバブル及びマイクロバブル・PAH複合体の電場依存性を調べた。

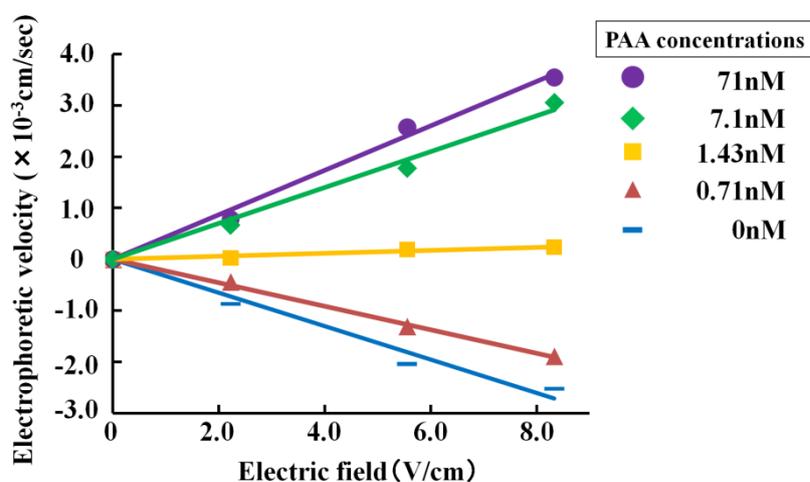


図6.6 マイクロバブル・PAH複合体(分子量56000)の移動度の電場依存性

図6.6は、縦軸を泳動速度($\times 10^{-3}$ cm/sec)、横軸を電場(V/cm)とし、傾きが正の時、カチオン性、負の時、アニオン性を示す。暗視野顕微鏡の観察におけるガラスセルの位置を変え、真の泳動速度を見積もり、電場2.22(V/cm)、5.55(V/cm)、8.33(V/cm)の3点で各々測定した。グラフは、マイクロバブルに添加したPAH(分子量56000)の高分子モル濃度で、青色は、添加なし、赤色は、0.71nM、黄色は、1.43nM、緑色は、7.1nM、紫色は、71nMを示す。各々の傾きは、添加するPAHの高分子モル濃度の小さい順に、 $-3.0 \times 10^{-4} \text{cm}^2 \text{S}^{-1} \text{V}^{-1}$ 、 $-2.0 \times 10^{-4} \text{cm}^2 \text{S}^{-1} \text{V}^{-1}$ 、 $3.0 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{S}^{-1} \text{V}^{-1}$ 、 $3.0 \times 10^{-4} \text{cm}^2 \text{S}^{-1} \text{V}^{-1}$ 、 $4.0 \times 10^{-4} \text{cm}^2 \text{S}^{-1} \text{V}^{-1}$ の傾きとなる。

それぞれのグラフが、電場に比例しているので、マイクロバブル及びマイクロバブル・PAH複合体が、電場依存性があること分かる。これは、この傾きが、移動度を示しているといえる。また、PAHを加えていくと、傾きが、正の値から負の値に変化した。これは、PAHの高分子モル濃度の変化で、PAHを添加したマイクロバブルが、電荷符号反転していると考察できる。そして、マイクロバブルに添加するPAHの高分子モル濃度が、1.43nMの時、傾きは0に近付いている。これは、マイクロバブル・PAH複合体が、電荷的中和状態に近いと考えられる。この電荷的中和状態におけるPAHの高分子モル濃度を用いて、次項で示す2種類のPAHを添加したマイクロバブルの電荷符号反転特性を評価する。

また、図3.4が示すように、PAHの添加によるpH変化で、電荷が反転した可能性があるため、pHメーターで計測した。まず、標準試料として、PAH添加により反転済みのシリカ粒子溶液のpHは、7.45となり、pHによる電荷符号反転は考えにくいと分かった。次に、PAH添加により反転済みのマイクロバブル溶液のpHは、6.87となり、図3.4では、負電荷を帯びている条件であるが、移動度から正電荷を帯びているので、pH変化による電荷符号反転ではなく、マイクロバブル自体が、正電荷へと電荷符号反転したと考えられる。

6.4 2種類のPAH添加によるマイクロバブルの電荷符号反転特性の比較

図 6.6 より、分子量 56000（鎖長が長い）PAH 添加によるマイクロバブルの移動度を求めた。同様な実験方法で、分子量 15000（鎖長が短い）PAH 添加によるマイクロバブルにおける電場依存性を調べ、傾きから移動度を求めた。

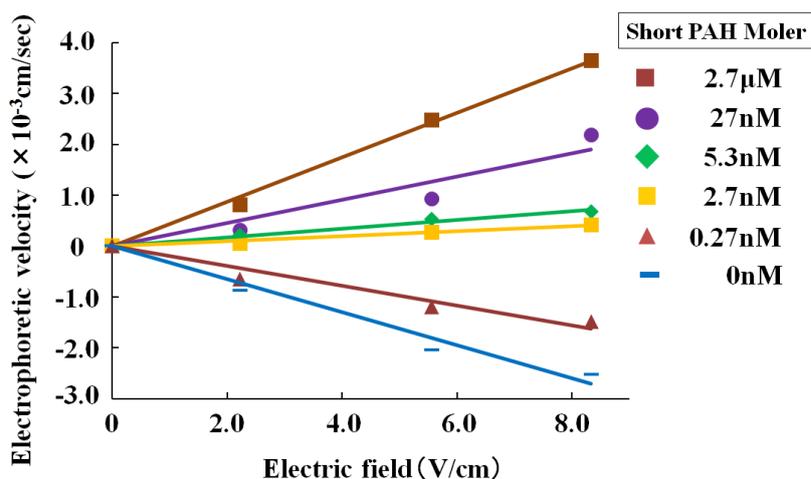


図6.7 マイクロバブル及びマイクロバブル・PAH(分子量15000)複合体の移動度

図6.7は、縦軸を泳動速度($\times 10^{-3}$ cm/sec)、横軸を電場(V/cm)とし、傾きが正の時、カチオン性、負の時、アニオン性を示す。暗視野顕微鏡の観察におけるガラスセルの位置を変え、真の泳動速度を見積もり、電場2.22(V/cm)、5.55(V/cm)、8.33(V/cm)の3点で各々測定した。グラフは、マイクロバブルに添加したPAH（分子量15000）の高分子モル濃度で、青色は、添加なし、赤色は、0.27nM、黄色は、2.7nM、緑色は、5.3nM、紫色は、27nM、茶は、2.7μMを示す。各々の傾きは、添加するPAHの高分子モル濃度が小さい順に、 $-3.0 \times 10^{-4} \text{cm}^2 \text{S}^{-1} \text{V}^{-1}$ 、 $-2.0 \times 10^{-4} \text{cm}^2 \text{S}^{-1} \text{V}^{-1}$ 、 $5.0 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{S}^{-1} \text{V}^{-1}$ 、 $9.0 \times 10^{-4} \text{cm}^2 \text{S}^{-1} \text{V}^{-1}$ 、 $-2.0 \times 10^{-4} \text{cm}^2 \text{S}^{-1} \text{V}^{-1}$ 、 $-4.0 \times 10^{-4} \text{cm}^2 \text{S}^{-1} \text{V}^{-1}$ の傾きとなる。

このことから、鎖長が短い分子量15000のPAH添加におけるマイクロバブルの電場依存性も、鎖長が長いPAH同様に、比例関係が成り立ち、電場依存性があることが分かった。そして、電荷的中状態におけるPAHの高分子モル濃度は、1.0nM~2.7nM付近であることが、グラフの傾きが小さくなることから推測する。

次に、移動度から、鎖長が違う2種類のPAH添加におけるマイクロバブルの電荷符号反転特性を比較する。そして、2種類のPAHにおける移動度と高分子モル濃度の関係を調べた。

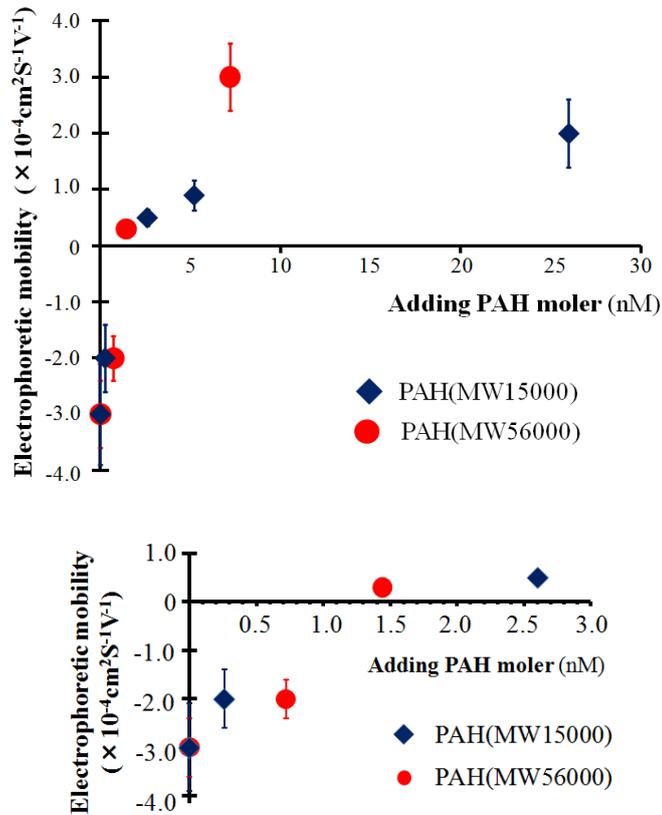


図6.8 2種類のPAH・マイクロバブル複合体の電荷符号反転グラフ

図6.8は、縦軸を先ほど求めた移動度($\times 10^{-4} \text{cm}^2 \text{S}^{-1} \text{V}^{-1}$)、横軸を添加したPAHの高分子モル濃度とし、正の値はカチオン性、負の値はアニオン性を示す。また、赤色は、分子量56000のPAH、青色は、分子量15000のPAHをマイクロバブルに添加したグラフである。

このグラフから、電荷の中状態におけるPAHの高分子濃度は、鎖長が長い場合、1.43nM付近で、鎖長が短い場合、1.0nM~2.7nMとなり、反転前後では、鎖長依存性が小さいと考察する。また、反転後について以下のように考察する。鎖長が長いPAHより、鎖長が短いPAHを添加した高分子モル濃度が大きいにもかかわらず、反転後の移動度は、鎖長が長いPAH添加のマイクロバブルの方が大きい。これは、マイクロバブル表面に、PAHの高分子モル濃度が高いほど吸着し、移動度が増加するという推察とは違い、シリカ粒子が示す電荷符号反転現象と違い、マイクロバブル表面に、PAHがほぼ完全に吸着しているは考えにくい。そこで、次項では、シリカ粒子と電荷モル濃度を利用して電荷量の比較を行った。

6.5 マイクロバブルの電荷量の算出

まず、本研究では、マイクロバブルとシリカ粒子の電荷量の比較を行うにあたり、PAHは鎖長の長い分子量 56000 を利用する。電荷的中和状態における PAH の添加した高分子モル濃度は、1.43nM なので、以下の式にして、シリカ粒子の電荷算出と同様に、電荷モル濃度を求める。

$$\frac{1.43 \times 10^{-9} \times 56000}{57} = 1.4 \times 10^{-6} = 1.4 \mu\text{M} \quad (6.1)$$

ちなみに、57g/mol は、+1 価を帯びているアリルアミンの分子量で、マイクロバブルにおける電荷的中和状態に必要な電荷モル濃度は、1.4 μ M と見積もれた。

そして、マイクロバブルの表面電荷量を、電荷中和状態における PAH の高分子モル濃度から見積もると、電荷的中和状態に必要とされる PAH の全電荷量個数と、1L におけるマイクロバブルの総数の商より、マイクロバブル 1 個あたりの表面電荷量が算出できる。本研究で使用したマイクロバブルを含んだ溶液の数密度は、シリカ粒子の数密度と同様にしているため、 9.6×10^5 個/ml で、

$$\frac{1.4 \times 10^{-6} \times 6.02 \times 10^{23}}{9.6 \times 10^5 \times 1000\text{ml}} = \frac{1.4 \times 6.02}{9.6} \times 10^9 = 8.78 \times 10^8 \quad (6.2)$$

となり、マイクロバブルの裸の電荷量は、 -8.78×10^8 と見積もることができる。この値を 1nm^2 あたりのマイクロバブルの電荷量で示すと、

$$\frac{8.78 \times 10^8}{4\pi \cdot 2} = \frac{8.78 \times 10^8}{4 \times 3.14 \times (214.4)^2} = 1520.7 \quad (6.3)$$

と算出できる。これは、マイクロバブルの表面 1nm^2 あたり -1521 価を帯びていることとなり、シリカ粒子の化学結合より、密に電荷を帯びることは考えにくい。そのため、電荷符号反転時、マイクロバブルの表面に対し、PAH の吸着がシリカ粒子と違うと考える。そこで、以下のような考察を行う。PAH は、鎖長の長さに関係なく PAH の一部のカウンターイオンが、マイクロバブルの表面に接触し、電荷符号反転が生じていると考える。

第7章 アニオン高分子添加による ヒストンの電荷符号反転特性

7.1 DNA 添加によるヒストンの電荷符号反転

まず、暗視野顕微鏡で観察するガラスセルの中央部で、電場 5.55V/cm とし、ヒストンクラスター及び λ DNA 添加によるヒストンクラスターの泳動速度を測定し、ヒストグラムを作成した。

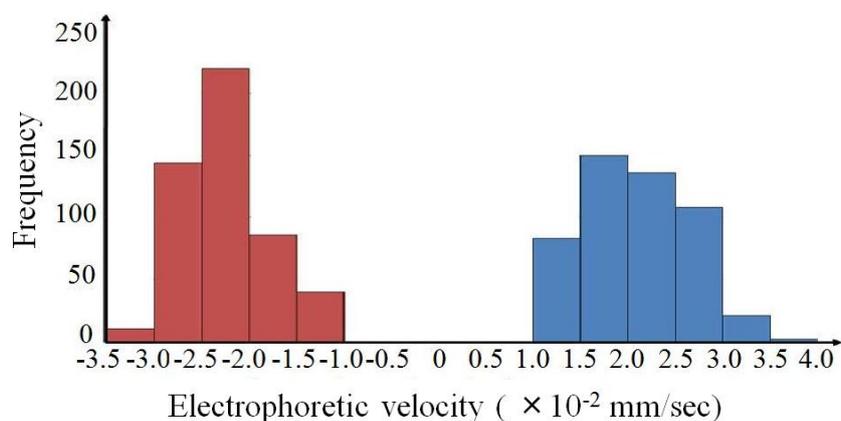


図 7.1 ヒストンクラスター及び λ DNA・ヒストンクラスター複合体の電気泳動ヒストグラム

図 7.1 は、縦軸を頻度、横軸を泳動速度($\times 10^{-2}$ mm/sec)とし、正の値をカチオン性、負の値をアニオン性とする。各々のヒストグラムは、ヒストンクラスター(2mg/l)に添加した λ DNA の電荷モル濃度で、青は、添加なし、赤は、 $1.74\mu\text{M}$ を示す。

このヒストグラムから、ヒストンクラスターがカチオン性で、 λ DNA 添加したヒストンクラスターがアニオン性だとわかる。そして、 λ DNA の電荷モル濃度を高くしていくと、電荷符号反転が生じることが考えられる。また、各々のヒストグラムは、単分散しているといえ、ヒストンクラスター及び λ DNA・ヒストンクラスター複合体は、電荷的安定し、分散していると考察できる。

次に、三種類の DNA 添加によるヒストンクラスターの電場依存性を調べた。ヒストン溶液の濃度は、2mg/l に統一し、3 種類の DNA は、 λ DNA (約 480502 塩基対)、 ϕ DNA (約 5386 塩基対)、サーモン DNA (塩基対不明) を利用した。

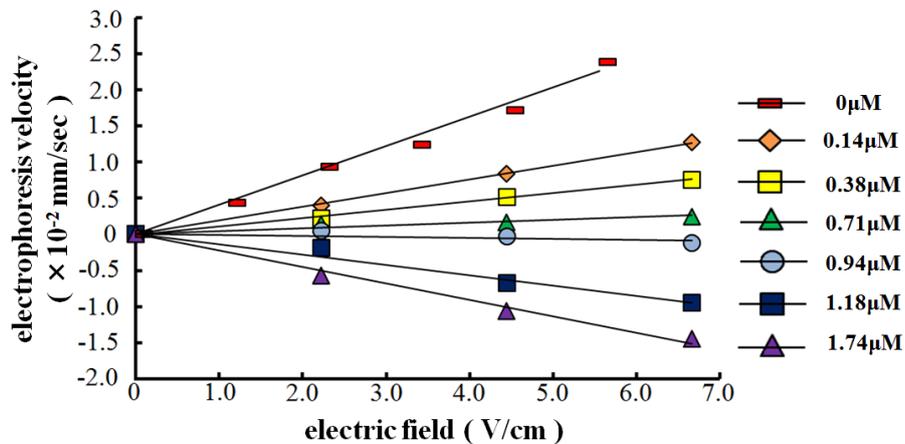


図 7.2 ヒストンクラスター及び λ DNA・ヒストンクラスター複合体の移動度

図7.2は、縦軸を泳動速度($\times 10^2$ mm/sec)、横軸を電場(V/cm)とし、傾きが正の時、カチオン性、負の時、アニオン性を示す。暗視野顕微鏡の観察におけるガラスセルの位置を変え、真の泳動速度を測定し、ヒストンのみの移動度は、図4.13を利用して、他の試料は、電場2.22(V/cm)、4.44(V/cm)、6.67(V/cm)の3点で測定した。グラフは、ヒストン溶液(2mg/l)に添加した λ DNA(約48502塩基対)の電荷モル濃度を表し、赤色は、添加なし、橙色は、0.14 μ M、黄色は、0.38 μ M、緑色は、0.71 μ M、水色は、0.94 μ M、青色は、1.18 μ M、紫色は、1.74 μ Mを示す。各々の傾きは、添加する λ DNAの電荷モル濃度が小さい順に、 $4.0 \times 10^{-4} \text{cm}^2 \text{S}^{-1} \text{V}^{-1}$ 、 $2.0 \times 10^{-4} \text{cm}^2 \text{S}^{-1} \text{V}^{-1}$ 、 $1.0 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{S}^{-1} \text{V}^{-1}$ 、 $4.0 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{S}^{-1} \text{V}^{-1}$ 、 $-1.0 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{S}^{-1} \text{V}^{-1}$ 、 $-1.0 \times 10^{-4} \text{cm}^2 \text{S}^{-1} \text{V}^{-1}$ 、 $-2.0 \times 10^{-4} \text{cm}^2 \text{S}^{-1} \text{V}^{-1}$ の傾きとなる。

このグラフから、ヒストンクラスター及びヒストンクラスター・ λ DNA複合体は、電場に対して、比例関係となり、電場依存性があるといえる。そして、このグラフの傾きは、移動度となり、0.71 μ Mから0.94 μ Mの間で、傾きが少ないことから、この値が、電荷中和時状態における λ DNAの電荷モル濃度であると分かる。

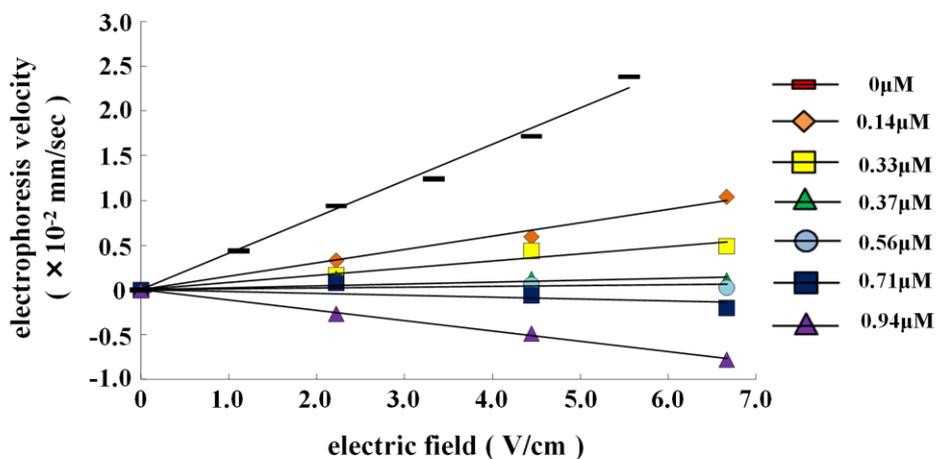


図 7.3 ヒストンクラスター及び ϕ DNA・ヒストンクラスター複合体の移動度

図7.3は、縦軸を泳動速度($\times 10^2$ mm/sec)、横軸を電場(V/cm)とし、傾きが正の時、カチオン性、負の時、アニオン性を示す。暗視野顕微鏡の観察におけるガラスセルの位置を変え、真の泳動速度を測定し、ヒストンのみの移動度は、図4.13を利用して、他の試料は、電場2.22(V/cm)、4.44(V/cm)、6.67(V/cm)の3点で測定した。グラフは、ヒストン溶液(2mg/l)に添加した ϕ DNA(約5386塩基対)の電荷モル濃度を表し、赤色は、添加なし、橙色は、0.14 μ M、黄色は、0.33 μ M、緑色は、0.37 μ M、水色は、0.56 μ M、青色は、0.71 μ M、紫色は、0.94 μ Mを示す。各々の傾きは、添加する ϕ DNAの電荷モル濃度が小さい順に、 $4.0 \times 10^{-4} \text{cm}^2 \text{S}^{-1} \text{V}^{-1}$ 、 $1.0 \times 10^{-4} \text{cm}^2 \text{S}^{-1} \text{V}^{-1}$ 、 $8.0 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{S}^{-1} \text{V}^{-1}$ 、 $2.0 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{S}^{-1} \text{V}^{-1}$ 、 $9.0 \times 10^{-6} \text{cm}^2 \text{S}^{-1} \text{V}^{-1}$ 、 $-2.0 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{S}^{-1} \text{V}^{-1}$ 、 $-1.0 \times 10^{-4} \text{cm}^2 \text{S}^{-1} \text{V}^{-1}$ の傾きとなる。

このグラフから、48502塩基対である λ DNAより、鎖長が短い5386塩基対の ϕ DNAについても、ヒストンクラスターに添加した場合の電場依存性があると分かった。そして、移動度は、このグラフの傾きを示しているので、傾きが小さい時が電荷的中和状態となる。よって、電荷的中和状態における ϕ DNAの電荷モル濃度は、0.56 μ M付近だと考察できる。

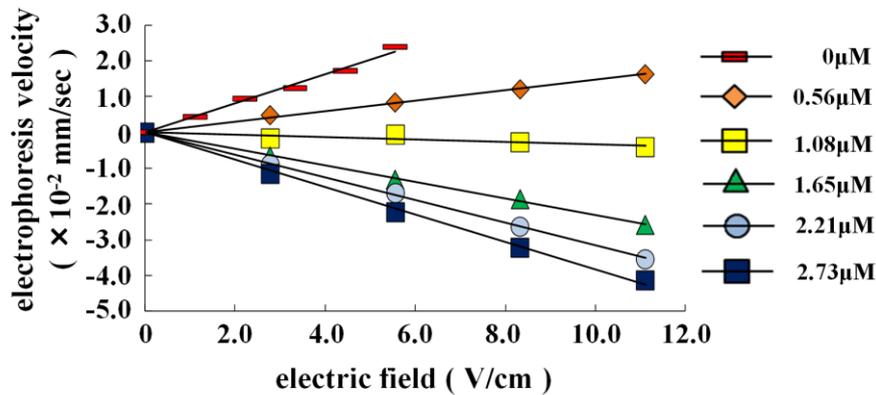


図 7.4 ヒストンクラスター及びサーモン DNA・ヒストンクラスター複合体の移動度

図7.4は、縦軸を泳動速度($\times 10^{-2}$ mm/sec)、横軸を電場(V/cm)とし、傾きが正の時、カチオン性、負の時、アニオン性を示す。暗視野顕微鏡の観察におけるガラスセルの位置を変え、真の泳動速度を測定し、ヒストンのみの移動度は、図4.13を利用して、他の試料は、電場2.78(V/cm)、5.56(V/cm)、8.33(V/cm)、11.11(V/cm)の4点で測定した。グラフは、ヒストン溶液(2mg/l)に添加したサーモンDNA(塩基対不明)の電荷モル濃度を表し、赤色は、添加なし、橙色は、0.56 μ M、黄色は、1.08 μ M、緑色は、1.65 μ M、水色は、2.21 μ M、青色は、2.73 μ Mを示す。各々の傾きは、添加するサーモンDNAの電荷モル濃度が小さい順に、 $4.0 \times 10^{-4} \text{cm}^2 \text{S}^{-1} \text{V}^{-1}$ 、 $1.0 \times 10^{-4} \text{cm}^2 \text{S}^{-1} \text{V}^{-1}$ 、 $-3.0 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{S}^{-1} \text{V}^{-1}$ 、 $-2.0 \times 10^{-4} \text{cm}^2 \text{S}^{-1} \text{V}^{-1}$ 、 $-3.0 \times 10^{-4} \text{cm}^2 \text{S}^{-1} \text{V}^{-1}$ 、 $-4.0 \times 10^{-4} \text{cm}^2 \text{S}^{-1} \text{V}^{-1}$ の傾きとなる。

このことから、サーモン DNA の添加によるヒストンクラスターでも、電場依存性があると分かり、電荷的中時のサーモン DNA の電荷モル濃度が、0.56 μ M から 1.08 μ M と推測できる。

さらに、3種類の DNA 添加におけるヒストンの電荷符号反転特性の図 7.5 のグラフにまとめた。

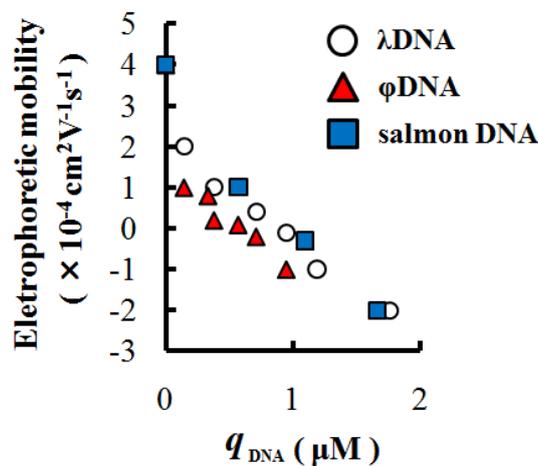


図 7.5 3 種類の DNA 添加によるヒストンクラスターの電荷符号反転グラフ

図 7.5 は、縦軸を先ほど求めた移動度($\times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$)、横軸を添加した 3 種類の添加した DNA の電荷モル濃度 $q_{\text{DNA}}(\mu\text{M})$ とし、正の値はカチオン性、負の値はアニオン性を示す。また、白色は、約 48502 塩基対の λDNA 、赤色は、約 5386 塩基対の ϕDNA 、青色は、塩基対不明のサーモン DNA を 2mg/l のヒストン溶液に添加したグラフである。

このグラフから、DNA の種類に関係なく、DNA の電荷モル濃度がほぼ一致するので、ヒストンは、DNA の品種や鎖長に関係なく、化学量論に電荷符号反転が生じていると考察できる。また、その値は、0.6 μM から 0.9 μM と見積もることができ、次項で、ヒストンオクタマーと、ヒストンクラスターの電荷量の算出を行う。

7.2 ヒストンクラスター及びヒストンオクタマーの電荷量算出

まず、Wette らの論文 [33]では、裸の電荷量（表面電荷量）が違うコロイド粒子の実効電荷量を測定すると、実効電荷量は、裸の電荷量が増加しても、ある一定の実効電荷量の上限があることを示している。この実験値から見積もりから実効電荷量算出式を表す経験式が報告され、その式は以下のように示されている。

$$Z_{\text{eff}} = \frac{fa}{l_B} \quad (7.1)$$

ちなみに、 Z_{eff} が経験式から見積もられた実効電荷量、 a は半径、 l_B は Bjerrum 長を示す。 f は、後に説明する。そして、Bjerrum 長は、

$$l_B = \frac{e^2}{4\pi\epsilon\epsilon_0 k_B T} \quad (7.2)$$

の式から、20°Cのとき、0.73 となる。

次に、 f は、図 7.6 から実験値で示されている値として、5~8 をとる。

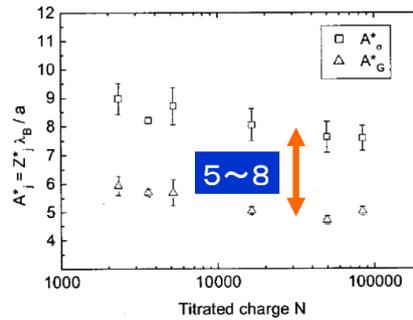


図 7.6 実験値から示された裸の電荷量 vs 実効電荷量 [33]

ヒストンの半径 a は、動的光散乱または、画像解析による拡散係数から算出した 40nm~50nm、Bjerrum 長である l_B に 0.73 を代入し、実効電荷の最小値と最大値を見積もると、最小値は、

$$Z_{\min}^* = \frac{5 \times 40}{0.73} = 274 \quad (7.3)$$

最大値は、

$$Z_{\max}^* = \frac{8 \times 50}{0.73} = 548 \quad (7.4)$$

となり、実験値からの見積もりは、ヒストンのメゾクラスターの実効電荷量+274~+548 となる。

次に、ヒストンと DNA の電荷的中和状態における DNA の電荷モル濃度 q_{DNA} から、ヒストンオクタマーの電荷量を算出する。ヒストン溶液は、第 4 章で示したように、ヒストンオクタマーとヒストンメゾクラスターが共存しているので、電荷的中和状態における DNA 電荷モル濃度は、ヒストンオクタマーとヒストンメゾクラスターの両方を考慮する必要がある。そのため、ヒストンオクタマーの実効電荷量を求めるため、以下の式が成り立つ。

$$q_{\text{DNA}} = Z_{\text{meso}} \times C_{\text{meso}} + Z_{\text{octa}} \times C_{\text{octa}} \quad (7.5)$$

q_{DNA} は、電荷的中和状態における DNA の電荷モル濃度、 Z_{meso} は、先ほどの経験式から算出したヒストンメゾクラスターの電荷量+274~+548 を使い、 C_{meso} は、2mg/l におけるヒストンメゾクラスターの高分子モル濃度、 z_{octa} は、ヒストンオクタマーの電荷、 c_{octa} は、ヒストンオクタマーの高分子モ

ル濃度を示している。各々の算出方法を示す。

DNA 電荷モル濃度 q_{DNA} は、図 7.5 の 3 種類の DNA の反転濃度グラフから、電荷の中和状態では、 $0.6\mu\text{M}\sim 0.9\mu\text{M}$ と見積られる。ちなみに、DNA 添加によるヒストンの電荷符号反転から表した値は、DNA のカウンターイオンを含んだ値である。

C_{meso} は、以下のように算出できる。180nm の Aminated Polystyrene を標準試料として、2mg/l のヒストン溶液におけるヒストンメゾクラスターの数密度を検討した結果、暗視野顕微鏡下でのヒストンクラスターの数密度が、 9×10^8 個/ml となり、アボガドロ数 6.02×10^{23} 個/mol で割ると、ヒストンメゾクラスターのモル濃度 C_{meso} は、

$$C_{\text{meso}} = \frac{9\times 10^8}{6.02\times 10^{23}} \approx 1.5\times 10^{-15} \text{ mol/ml} = 1.5\times 10^{-6} \mu\text{M} \quad (7.6)$$

となり、 $1.5\times 10^{-6}\mu\text{M}$ と求めることが出来た。

c_{octa} は、今回の電荷符号反転特性の実験に使用しているヒストンの濃度が、2mg/l で、ヒストンオクタマーの平均分子量が 108000g/mol より、

$$c_{\text{octa}} = \frac{2\times 10^{-3}}{108000} \text{ mol/l} = 1.85\times 10^{-2} \mu\text{M} \quad (7.7)$$

となり、 $1.85\times 10^{-2}\mu\text{M}$ と算出した。

これらの値を代入して、 z_{octa} を求める。この最小値として、 z_{octa} に +274、 q_{DNA} に $0.6\mu\text{M}$ を代入すると、

$$0.6 = 274\times 1.5\times 10^{-6} + z_{\text{octa}}\times 1.85\times 10^{-2} \quad (7.8)$$

$$z_{\text{octa}} = 32.41$$

で、最大値として、 Z_{octa} に +548、 q_{DNA} に $0.9\mu\text{M}$ を代入すると、

$$0.9 = 548\times 1.5\times 10^{-6} + z_{\text{octa}}\times 1.85\times 10^{-2} \quad (7.9)$$

$$z_{\text{octa}} = 48.60$$

となり、 z_{octa} は、+32.4~+48.6 と見積もることができた。この値は、Khrapunov らの論文[34]の値とほぼ同値であることから妥当性が示唆される。

また、ヒストンオクタマーの電荷量の見積もりの他に、以上のデータから、2つのことが考察できる。

1つ目は、ヒストンオクタマーのモル濃度が、ヒストンメゾクラスターのモル濃度の約 10^4 倍とはるかに多い。このことから、ヒストン溶液中に、ヒストンオクタマーが、ヒストンオクタマーより多量に存在していることが考えられる。これは、FE-SEM の観察図 (図 4.9) や、SDS 添加にお

ヒストンクラスターの暗視野顕微鏡画像からも示唆される (図 4.26)。

2 つ目は、ヒストンメゾクラスターの総電荷量は、ほぼ無視できる。よって、電荷符号反転現象は、DNA 添加によって、ヒストンメゾクラスターを反転させるだけでなく、ヒストンオクタマーも反転させていることが考察できる。そして、本研究では、暗視野顕微鏡下での画像から、添加した DNA の反転濃度を見積もった。つまり、ヒストンメゾクラスターの反転現象しか観察かつ測定できていない。しかし、Khrapunov らの論文とヒストンオクタマーの電荷量が、ほぼ一致することから、DNA 添加によるヒストンメゾクラスターの電荷符号反転の測定で、ヒストン溶液全体の電荷符号反転特性を知ることができると推測できる。

さらに、ヒストンメゾクラスターの実効電荷量を求める他の方法として、移動度と以下で詳細を示す κa から検討する。 κ の逆数である $1/\kappa$ は、遮蔽長なので、以下の式で求めることができる。

$$\kappa^2 = 4\pi_B Z^2 C \quad (7.10)$$

Z は価数、 C は自由イオンのモル濃度を示している。

ヒストンメゾクラスターに対するイオンの環境から 2 つに区別できる。それは、ヒストンメゾクラスターに対し、カウンターイオンとして、水素イオンや水酸化物イオンの他に、ヒストンオクタマーを想定しない場合 (i) と、ヒストンオクタマーを想定する場合 (ii) がある。

(i) ヒストンクラスターのカウンターイオンに、ヒストンオクタマーを想定しない場合は、

$$\kappa_1^2 = 4\pi_B \times (q_{\text{DNA}} + q_{\text{H}^+} + q_{\text{OH}^-}) \times N_A \times 1000 \quad (7.11)$$

q_{H^+} は、水素イオンの価数の乗数と水素イオンのモル濃度の積なので、 $1.0 \times 10^{-7} \text{M}$ となり、 q_{OH^-} は、水酸化物イオンの価数の乗数と水酸化物イオンのモル濃度の積より $1.0 \times 10^{-7} \text{M}$ と算出できる。

最小値は、電荷的中和状態となる DNA の電荷モル濃度 q_{DNA} に $0.6 \mu\text{M}$ を代入して、

$$\kappa_{\min}^2 = 4 \times 3.14 \times 0.73 \times 10^{-9} \times (0.6 \times 10^{-6} + 1.0 \times 10^{-7} + 1.0 \times 10^{-7}) \times 6.02 \times 10^{23} \times 1000 \approx 4.416 \times 10^{12} \quad (7.12)$$

となり、最大値は、同様な方法で、DNA の電荷モル濃度 q_{DNA} に $0.9 \mu\text{M}$ を代入して、

$$\kappa_{\max}^2 = 4 \times 3.14 \times 0.73 \times 10^{-9} \times (0.9 \times 10^{-6} + 1.0 \times 10^{-7} + 1.0 \times 10^{-7}) \times 6.02 \times 10^{23} \times 1000 \approx 6.072 \times 10^{12} \quad (7.13)$$

となり、遮蔽長の最小値、最大値は、

$$\kappa_{\max}^{-1} = (\sqrt{6.072 \times 10^6})^{-1} \approx 0.041 \times 10^{-5} = 0.41 \mu\text{m} \quad (7.14)$$

$$\kappa_{\min}^{-1} = (\sqrt{4.416 \times 10^6})^{-1} \approx 0.048 \times 10^{-5} = 0.48 \mu\text{m} \quad (7.15)$$

であるから、ヒストンメゾクラスターの遮蔽長は、410nm から 480nm と算出できる。そして、 κa の最小値と最大値を見積もる。

最小値は、 κ の最小値、半径 a には、40nm を代入すると、

$$\kappa a = \sqrt{4.416} \times 10^6 \times 4 \times 10^{-8} = 0.084 \quad (7.16)$$

最大値は、 κ の最大値、半径 a には、50nm を代入すると、

$$\kappa a = \sqrt{6.072} \times 10^6 \times 5 \times 10^{-8} = 0.123 \quad (7.17)$$

で、 κa は、0.084 から 0.123 と求めることができた。

(ii) ヒストンクラスターのカウンターイオンに、ヒストンオクタマーを想定する場合

$$\kappa_2^2 = 4\pi d_B \times (q_{\text{DNA}} + q_{\text{octa}} + q_{\text{H}^+} + q_{\text{OH}^-}) \times N_A \times 1000 \quad (7.18)$$

となり、ヒストンオクタマーを算出する際に、

$$q_{\text{DNA}} \approx Z_{\text{octa}} \times C_{\text{octa}} \quad (7.19)$$

という式が成り立つので、それを代入すると、 q_{octa} の式は

$$q_{\text{octa}} = Z_{\text{octa}}^2 \times C_{\text{octa}} \approx Z_{\text{octa}} \times q_{\text{DNA}} \quad (7.20)$$

と変形でき、

$$\kappa_2^2 = 4\pi d_B \times \left\{ (1 + Z_{\text{octa}}) q_{\text{DNA}} + q_{\text{H}^+} + q_{\text{OH}^-} \right\} \times N_A \times 1000 \quad (7.21)$$

となり、 z_{octa} は、DNA の反転濃度から見積もった +32.4 ~ +48.6 で、 q_{H^+} は、水素イオンの価数の乗数と水素イオンのモル濃度の積である $1.0 \times 10^{-7} \text{M}$ 、 q_{OH^-} は、水酸化物イオンの価数の乗数と水酸化物イオンのモル濃度の積となる $1.0 \times 10^{-7} \text{M}$ を代入する。

最小値には、 q_{DNA} に $0.6 \mu\text{M}$ 、 Z_{octa} に +32.4 を、最大値には、 q_{DNA} に $0.9 \mu\text{M}$ 、 Z_{octa} に +48.6 を代入すると、

$$\begin{aligned} \kappa_{\text{min}}^2 &= 4 \times 3.14 \times 0.73 \times 10^{-9} \times \left\{ (1 + 32.4) \times 6.0 \times 10^{-7} + 1.0 \times 10^{-7} + 1.0 \times 10^{-7} \right\} \times 6.02 \times 10^{23} \times 1000 \\ &= 1.117 \times 10^{14} \end{aligned} \quad (7.22)$$

$$\begin{aligned} \kappa_{\text{min}}^2 &= 4 \times 3.14 \times 0.73 \times 10^{-9} \times \left\{ (1 + 48.6) \times 9.0 \times 10^{-7} + 1.0 \times 10^{-7} + 1.0 \times 10^{-7} \right\} \times 6.02 \times 10^{23} \times 1000 \\ &= 2.475 \times 10^{14} \end{aligned} \quad (7.23)$$

となり、遮蔽長の最小値、最大値は、

$$\kappa_{\min}^{-1} = \frac{10^{-7}}{\sqrt{2.475}} = 64 \times 10^{-9} = 64 \text{nm} \quad (7.24)$$

$$\kappa_{\max}^{-1} = \frac{10^{-7}}{\sqrt{1.117}} = 95 \times 10^{-9} = 95 \text{nm} \quad (7.25)$$

で、ヒストンメゾクラスターの遮蔽長は、64nm から 95nm と算出できる。

そして、 κa の最小値と最大値を算出する。最小値には、 κ の最小値、半径 a には、40nm を、最大値には、 κ の最大値、半径 a には、50nm を代入すると、

$$\kappa a = \sqrt{1.117} \times 10^7 \times 4 \times 10^{-8} = 0.42 \quad (7.26)$$

$$\kappa a = \sqrt{2.475} \times 10^7 \times 5 \times 10^{-8} = 0.79 \quad (7.27)$$

と算出できる。

(i), (ii)より、 κa は、ほぼ $0.1 < \kappa a < 1$ の範囲となり、無塩状態であるヒュケルの式が適応できる。このヒュッケル式を利用するために、無次元移動度を算出する[1,35,36]。

無次元移動度 E_m は、電気泳動測定装置から算出した移動度を利用する。20°C のとき、無次元移動度は、

$$E_m = \frac{3e \times 4\pi\eta}{2\epsilon k_B T} \mu = \frac{6\pi\eta\mu}{\epsilon} \times \frac{1}{25.27 \text{mV}} \quad (7.28)$$

の式で成り立っている。ちなみに、 η は粘度で、0.010020poise、 ϵ は誘電率で、80.35 (20°C) を示し、図 4.13 から読み取ったヒストンクラスターの移動度 $4.0 \times 10^{-4} (\text{cm}^2 \text{S}^{-1} \text{V}^{-1})$ を代入すると、

$$E_m = \frac{6 \times 3.14 \times 0.010020 \times 4.0 \times 10^{-4} \times 300 \times 300 \times 1000}{80.35 \times 25.27} = 3.347 \approx 3.35 \quad (7.29)$$

となり、無次元移動度 E_m は、3.35 となった。さらに、ヒュッケル式は以下の式で、

$$E_m = Z_{\text{eff}} \frac{l_B}{a} \times \frac{1}{(1 + \kappa a)} \quad (7.30)$$

から、移行した式が、

$$Z_{\text{eff}} = E_m \frac{a}{l_B} (1 + \kappa a) \quad (7.31)$$

となるから、これらを含めて、ヒストンメゾクラスターの実効電荷量は以下ようになる。

実効電荷量 Z_{eff} の最小値は、 κa の最小値 0.084、ヒストンクラスターの半径 40nm を代入すると

$$Z_{\text{eff}}^{\text{min}} = \frac{3.35 \times 4 \times 10^{-8} \times (1 + 0.084)}{0.73 \times 10^{-9}} = 199.0 \quad (7.32)$$

となり、最大値は、 κa の最大値 0.79、ヒストンクラスターの半径 50nm を代入すると

$$Z_{\text{eff}}^{\text{min}} = \frac{3.35 \times 5 \times 10^{-8} \times (1 + 0.79)}{0.73 \times 10^{-9}} = 410.7 \quad (7.33)$$

と算出できた。

よって、無次元移動から見積もった実効電荷量 Z_{eff} は、+199.0～+410.7 と見積もることに成功した。これは、Wette らの経験式からの見積もりとほぼ一致するので、妥当性が示唆される。

したがって、ヒストンオクタマーの実効電荷量は、+32.4～+48.6 と見積もられ、ヒストンメゾクラスターの実効電荷量は、およそ+300～+400 と求めることができる。

7.3 DNA・ヒストンクラスター複合体の電荷中和時における形状変化

ヒストンクラスター・DNA 複合体の電荷的中状態において、DNA の種類の違いでの形状変化を発見した。サーモン DNA に比べて、 λ DNA では、時々、電気中和時に、サイズが大きくなり、ヒストンをより凝集していると考察できる。(図 7.7、図 7.8)

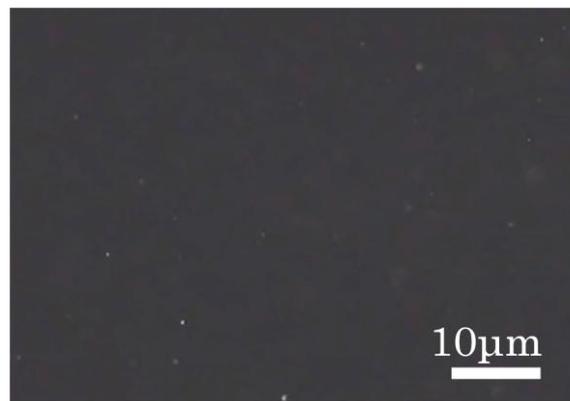


図 7.7 サーモン DNA・ヒストン複合体の電氣的中和時の形状変化

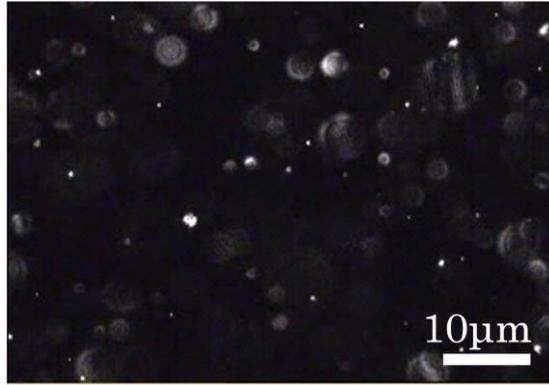


図 7.8 λ DNA・ヒストン複合体の電気的中和時の形状変化

第 8 章 まとめ

8.1 ヒストン溶液における平衡クラスターの存在

リゾチームの球状タンパク質における平衡クラスター形成には議論が多いが、本研究は、表面電荷の高いヒストンを利用することで、凝集物ではなく、ヒストンオクタマーが自己集積化したヒストンメゾクラスターの存在が確認できた。詳細は以下の通りである。

まず、動的光散乱によるヒストン溶液の測定において、3つの緩和を示したグラフを得た。この緩和を粒径換算して、13nm 程度、88nm 程度、3.8 μm 程度を示している。この値から、10nm 程度のヒストンオクタマー、ヒストンメゾクラスター、数 μm の凝集物が存在すると考察できる。また、暗視野顕微鏡の観察から画像解析して、拡散係数からサイズを見積もると、ヒストンメゾクラスターは、86nm 程度となった。さらに、FE-SEM 観察から、ヒストンクラスターが 100nm 程度と分かる。よって、ヒストンメゾクラスターは、80nm~100nm でサイズ分散していると考察できる。

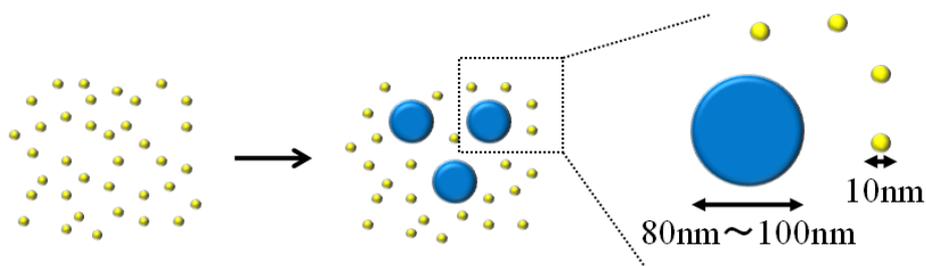


図 8.1 ヒストンクラスター形成とヒストンクラスターのサイズ分散

次に、遠心分離処理を行い、ヒストンオクタマーのみの状態を作成した後、暗視野顕微鏡で観察した。その結果、ヒストン溶液の濃度は変化なく、ヒストンオクタマーからヒストンクラスターを形成した。これは、ヒストン溶液において、平衡クラスターが形成されていると考える。さらに、FE-SEM 観察、SDS 添加によるヒストンクラスターの数密度増大、電気泳動装置によるヒストンクラスター兼ヒストンオクタマーの電荷算出で、電荷符号反転に必要な DNA の電荷量とヒストンオクタマーの電荷量が近似できる。この点を考慮すると、ヒストン溶液におけるヒストンクラスター形成は、多量のヒストンオクタマーの環境下で、微量なヒストンクラスターが形成される。この状態が、本研究でのヒストン溶液における平衡状態だと考える。

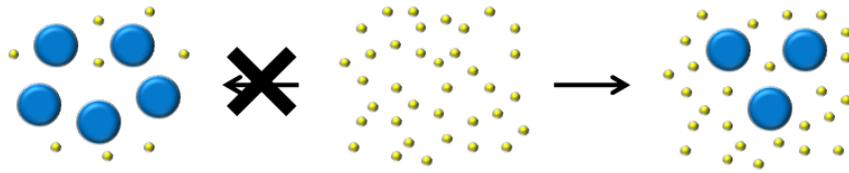


図 8.2 ヒストン溶液における平衡状態

8.2 マイクロバブル表面における PAH の吸着過程

気泡であるマイクロバブルは、カチオン性高分子である PAH に対して以下のような電荷符号反転をしたことを、シリカ粒子と比較して考察する。シリカ粒子の場合、カチオン性高分子の PAH を添加したところ、電荷的中状態における PAH の濃度から算出した値からは、PAH は、シリカ粒子の表面に、満遍なく吸着し電荷符号反転していると考察できる。

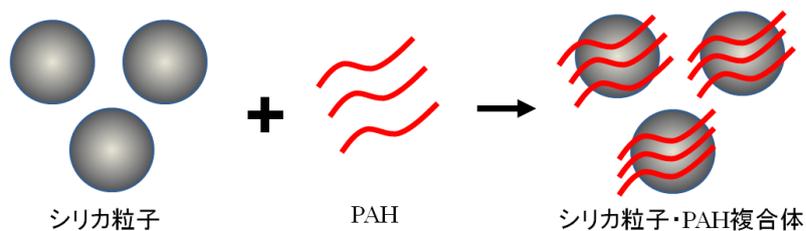


図 8.3 PAH 添加によるシリカ粒子の電荷符号反転の概図

しかし、気泡であるマイクロバブルの場合、電荷的中状態における PAH の濃度は、シリカ粒子と比較してはるかに大きい。このことから、シリカ粒子表面における PAH の吸着が異なり、電荷符号反転するために多量の PAH が必要となっている。また、鎖長が違う 2 種類の PAH 添加によるマイクロバブルの電荷符号反転から、電荷的中状態に必要とされる PAH の高分子モル濃度に、ほとんど差が見られない。さらに、同じモル濃度を添加した場合、鎖長が長い PAH の時が、電荷符号反転後の移動度が大きくなる。この結果を考察すると、図 8.4 のように、マイクロバブル表面には、鎖長の長さに関係なく、同量のカウンターイオンが吸着して、電荷符号反転していると考察できる。

その上、マイクロバブルの電荷反転に必要な PAH が、シリカ粒子のものより、多量なことから、マイクロバブルの表面に注目して考察する。気液界面の平衡状態において、マイクロバブルの表面には、水酸化物イオンが吸着している。そのため、PAH が、マイクロバブルに吸着するが、平衡状態を保つため、PAH 付きの水酸化物が離脱するため、多量の PAH よりマイクロバブルの表面電荷が低下する。これは、 Na^+ や Mg^{2+} を添加した場合でも、同様な現象が生じているが、本研究の場合、マイクロバブルの表面電荷低下に留まらず、電荷符号反転現象が起こっている。これは、非常に異様であると考察する。

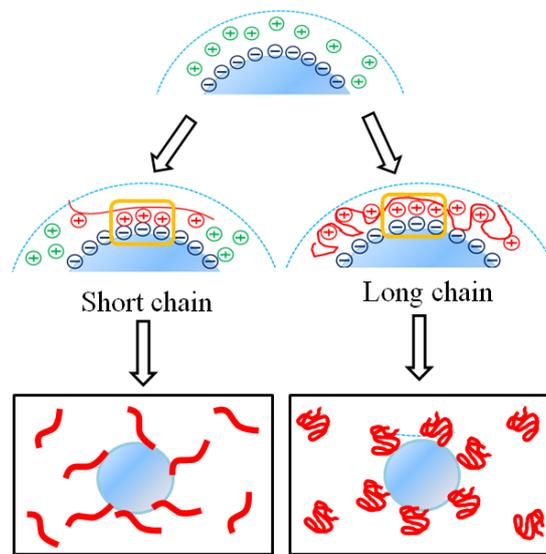


図 8.4 PAH 添加によるマイクロバブルの電荷符号反転特性

よって、本研究は、気泡のマイクロバブルに対するカチオン性高分子の電荷符号反転の現象における基礎的な電気的特性の評価から、マイクロバブル表面における PAH の吸着過程を推察した。これは、電荷符号反転現象において、マイクロバブルとカチオン性高分子は、新しい相互作用を示していると考えられる。

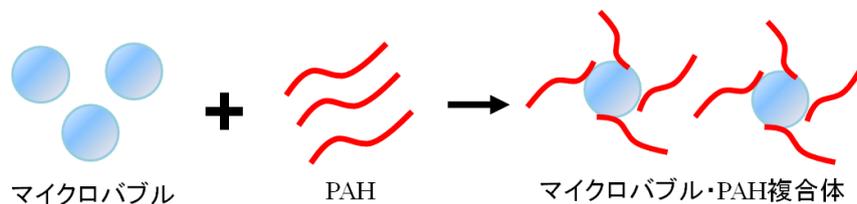


図 8.5 PAH 添加によるマイクロバブルの電荷符号反転の概図

8.3 DNA 添加によるヒストンクラスター及びヒストンオクタマーにおける電気的評価

泳動速度のヒストグラムや、移動度からヒストンオクタマー及びヒストンクラスターは、電荷的に安定分散している。そして、DNA 添加により、ヒストンの電荷符号反転特性を調べた結果、電荷的中和状態における DNA の電荷モル濃度は、種類に関係なく一定の値を示した。この値から、実験値からの経験式とヒュッケルの式を利用して、ヒストンクラスターの実効電荷量が、+300~+400 と見積もることに成功した。さらに、8.1 で示したように、ヒストンオクタマーは、ヒストンクラス

ターよりはるかに多いため、電荷符号反転に利用する DNA の電荷モル量と近似でき、ヒストンオクタマーの電荷量は、+32~+49 と算出した。さらに、DNA は、ヒストンオクタマーとヒストンクラスターの両方を電荷符号反転させている。

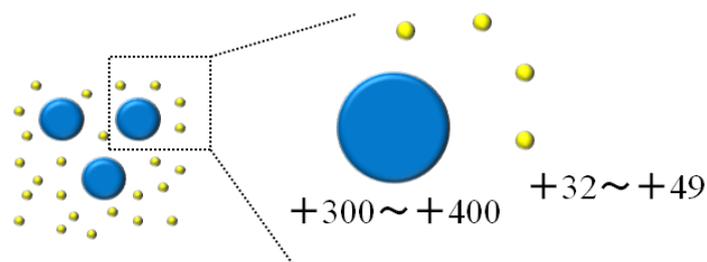


図 8.6 ヒストンオクタマー及びヒストンクラスターの電荷的分散

したがって、本研究は、ヒストンオクタマーと自己集積したヒストンクラスターの混合液において、DNA を添加し、電荷符号反転特性を評価することに成功した。このことは、ヒストンと DNA の関係は、ヒストンオクタマーと DNA で形成するヌクレオソームに留まらず、DNA と自己集積化したヒストンクラスターという別のアプローチにおける基礎的な電氣的評価を行えたと考察する。さらに、8.1 で示した自己集積化したヒストンクラスターの粒径は、可視化が可能であるため、“Colloidal molecules”分野でのタンパク質における研究が容易になったと推測する。



図 8.7 DNA 添加によるヒストンの電荷符号反転の概図

8.4 総括

本研究の成果から、マイクロバブルのような気泡や、ヒストンオクタマーと自己集積化したヒストンクラスターが混合する場合でも、荷電コロイド表面に対し、鎖長や種類に関係なく、多価カウンターイオンを含む高分子添加による電荷符号反転が生じたことがいえる。これは、カウンターイオンをもつ高分子を添加することで、複雑な環境下でも、荷電コロイドの電荷制御が可能であることを意味する。したがって、本研究は、気体領域や、超コロイドのような特殊な固体領域における電荷符号反転の基礎的な電氣的特性評価を行ったにとどまらず、電荷符号反転による電荷制御が、複雑系材料作成において有効的なアプローチとなることを支持している。

謝辞

本論文を結ぶにあたり、5年間の大学院での研究生活中、常に適切かつ詳細で丁寧な御指導を賜った古沢浩先生に心より感謝申し上げます。また、動的光散乱の測定方法を指導して下さった広島大学総合科学研究科の田中晋平先生に心より感謝申し上げます。そして、自由な研究生活を送ることを可能にしてくれた研究室の皆様と友人にこの場を借りて感謝致します。最後に長い学生生活を支えてくれた家族に感謝致します。

参考文献

1. O'Brein, R. W. & Hunter, R. J. , *Can. J. Chem.* **59**, 1878 (1981).
2. Mossa, S. , Sciortino, F. , Tartaglia, P. & Zaccarelli, E. , *Langmuir* **20**, 10756 (2004).
3. Sciortino, F. , Tartaglia, P. & Zaccarelli, E. , *J. Phys. Chem. B* **109**, 21942 (2005).
4. Royall, C. P. , Williams, S. R. , Ohtsuka, T. & Tanaka, H. , *Nature materials* **7**, 556 (2008).
5. Malins, A. , Williams, S. R. , Eggers, J. , Tanaka, H. & Royall, P. , *J. Phys. Condens. Matter* **21**, 425013 (2009).
6. Stradner, A. , Sedgwick, H. , Cardinaux, F. , Poon, W. C. K., Egelhaaf, S. U. & Schurtenberger, P. , *Nature* **432**, 492 (2004).
7. Grosberg, A. Y. , Nguyen, T. T. & Shklovskii, B. I. , *Rev. Mod. Phys.* **74**, 329 (2002).
8. Schiessel, H. , *J. Phys. Condens. Matter* **15**, R699 (2003).
9. Komagata, S. , *Denki Kagaku* **4**, 380 (1936).
10. Palberg, T. & Versmold, H. , *J. Chem. Phys.* **93**, 5296 (1989).
11. Bradford, M. , *Anal. Biochem.* **72**, 248 (1976).
12. Ushikubo, F. Y. *et al.* , *Colloids Surf. A.* **20**, 31 (2010).
13. Lentacker, I. *et al.* , *Langmuir* **22**, 7273 (2006).
14. Takahashi, M. , *J. Phys. Chem. B* **109**, 21858 (2005).
15. Li, C. & Somasundaran, P. , *J. Colloid Interface Sci.* **148**, 587 (1992).
16. Yoon, R. & Jordan, J. L. , *J. Colloid Interface Sci.* **113**, 430 (1992).
17. Ijiro, K. & Okahata, Y. , *J. Chem. Soc. , Chem. Commun.* , 1339 (1992).
18. Tanaka, K. & Okahata, Y. , *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 10679 (1996).
19. Hatuta, O. , Matsuo, Y. , Hashimoto, Y. , Niikura, K. & Ijiro, K. , *Langmuir* **24**, 2618 (2008).
20. Shimomura, M. & Kunitake, T. , *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 5175 (1987).
21. Shukla, A. , Mylonas, E. , Cola, E. D. , Finet, S. , Timmins, P. , Narayanan, T. & Svergun, D. I. , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 5075 (2008).
22. Liu, Y. , Frantini, E. , Baglioni, P. & Chen, S. H. , *Phys. Rev. Lett.* **95**, 118102 (2005).
23. Stradner, A. , Sedgwick, H. , Cardinaux, F. , S. U. & Schurtenberger, P. , *J. Phys. Chem. B* **110**, 21222 (2006).
24. Cardinaux, F. , Strander, A. , Schurtenberger, P. & Zaccarelli, E. , *Eur. Phys. Lett.* **77**, 48004 (2007).

25. Trehella, J. , *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **105**, 5075 (2008).
26. Sahoo, B. , Nag, S. , Sengupta, P. & Maiti, S. , *Biophys. J.* **97**, 1454 (2009).
27. Chirsty, A. A. & Egeberg, P. K. , *Analyst* **130**, 738 (2005).
28. Unger, E. C. , Hersh, E. , Vannan, M. , Matsunaga, T. O. & McCreery, T. , *Prig. Cardiovasc. Dis.* 44, 45 (2001).
29. Daiguji, H. , Matsuoka, E. & Muto, S. , *Soft Matter* **6**, 1892 (2010).
30. Johson, D. , Hilal, N. , Waters, K. , Hadler, K. & Cilliers, J. , *Langmuir* **25**, 4880 (2009).
31. Talu, E. , Lozano, M. M. , Powell, R. L. , Dayton, P. A. & Longo, M. L. , *Langmuir* **22**, 9487 (2006).
32. Borden, M. A. , Caskey, F. C. , Little, E. , Gillies, R. J. & Ferrara, K. W. , *Langmuir* **23**, 9401 (2007).
33. Wette, P. , Schope, H. J. & Palberg, T. , *J. Phys. Chem.* **116**, 10981-10988 (2002).
34. Khrapunov, S. N. , Dragan, A. I. , Sivolob, A. V. & Zagariya, A. M. , *Biochim. Biophys. Acta.* **1351**, 213 (1997).
35. Kim, K. , Nakayama, Y. & Yamamoto, R. , *Phys. Rev. Lett.* **96**, 208302 (2006).
36. Bocqut, L. , Trizac, E. & Aubouy, M. , *J. Chem. Phys.* 117, 17 (2002).

- J1. D. H. Evertt 著 関集三 監訳 「コロイド科学の基礎」 化学同人 (1992).
- J2. I. W. ハムレー 著 「ソフトマター入門」 シュプリンガー・フェアラーク東京 (2002).
- J3. T. Witten, P. Pincus 著 好村滋行、福田順一 訳 「ソフトマター物理学」 吉岡書店 (2010).
- J4. 古澤邦夫 「ゼータ電位の測定」 ぶんせき (2004).
- J5. 北原文雄、古澤邦夫、尾崎正孝、大島広行 「ゼータ電位」 サイエнтиスト社 (1995).
- J6. 高分子学会 「基礎高分子科学」 東京化学同人 (2006).
- J7. 押村光雄、伊藤敬 「エピジェネティクスと遺伝子発現機構」 羊土社 (2003).
- J8. 古田隆 「微細気泡の最新技術」 エヌ・ティ・エス (2006).